



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DE LOS ARNms
LIBERADOS EN EXOSOMAS EN EL ENTORNO
BIOLÓGICO DEL CÁNCER DE MAMA

TESIS DOCTORAL

MARTA RODRÍGUEZ MORENO
Madrid, 2016

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA



CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DE LOS ARNms LIBERADOS EN EXOSOMAS EN EL ENTORNO BIOLÓGICO DEL CÁNCER DE MAMA

TESIS DOCTORAL presentada por
MARTA RODRÍGUEZ MORENO
Licenciada en Biología,
Para optar al Grado de Doctor.

CO-DIRECTORES:

DRA. VANESA GARCÍA BARBERÁN
DR. FÉLIX BONILLA VELASCO

Universidad Autónoma de Madrid
Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital
Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda

D. FELIX BONILLA VELASCO, DOCTOR Y ONCÓLOGO MÉDICO, Y DÑA.VANESA GARCÍA BARBERÁN, DOCTORA E INVESTIGADORA CONTRATADA EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL HOSPITAL CLÍNICO DE SAN CARLOS,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Capacidad tumorigénica de los ARNms liberados en exosomas en el entorno biológico del cáncer de mama”, que presenta Dña. MARTA RODRÍGUEZ MORENO para la obtención del GRADO DE DOCTOR por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda y reúne las condiciones de calidad, contenido y forma exigibles para ser presentado ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Madrid a 3 de Junio de 2016.

Dr. Félix Bonilla Velasco

Director de Tesis

Dra. Vanesa García Barberán

Directora de Tesis

Este trabajo original, realizado en el Grupo de Investigación en Mecanismos Moleculares Tumores del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, ha sido financiado por el ISCIII-RTICC-RD06/0020/0020, la Fundación Banco Santander, la Fundación Científica AECC, SAF2010-20750, y la Ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) con número de expediente BES-2011-046126.

A mis padres, Rufo y Loli

A mi hermano, Javier

A mi marido, Pablo

RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea, y una de las causas más frecuentes de muerte por cáncer en los países desarrollados. Consiste en la adquisición de un fenotipo maligno y una proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular de la mama. Las células del cáncer de mama pueden diseminarse a través de la vascularización sanguínea y linfática, llegando a otras partes del cuerpo donde se adhieren a los tejidos y crecen formando metástasis. Existen evidencias de que las células madre tumorales están implicadas directamente en el proceso metastásico. Las células tumorales con elevada capacidad de pluripotencialidad poseen capacidad de autorrenovación, pueden originar las diferentes estirpes celulares que componen un tumor, necesitan un microambiente o nicho para desarrollarse, en la migración de las mismas está implicado el eje CXCL12/CXCR4, evaden el fenómeno de apoptosis y muestran resistencia a la quimioterapia. Es posible que la capacidad de crecimiento de la metástasis esté relacionada con un adecuado microambiente en el órgano diana, siendo elegidos aquellos órganos con un acondicionamiento preexistente, o bien pueda ser que el tumor primario lo genere utilizando mecanismos a distancia en los que podría estar implicada la comunicación intercelular mediada por exosomas. Las células tumorales secretan exosomas que transportan en su interior información molecular capaz de modificar la respuesta inmune, la proliferación celular, la angiogénesis y la metástasis.

En este trabajo abordamos si el material genético protegido en los exosomas liberados por las células tumorales proporciona al tumor un mayor crecimiento y diseminación, y si varía en función de la capacidad metastásica y pluripotencial de las células tumorales de las que provienen. Comprobamos si algunas de las funciones efectoras de los exosomas observadas *in vitro* se corroboran en experimentos con animales y, además, determinamos el valor pronóstico de factores moleculares relacionados e identificados en exosomas aislados de plasma de una serie de pacientes con cáncer de mama.

Los resultados muestran como los exosomas derivados de las células tumorales de mama que sobreexpresan *CXCR4* tienen la capacidad de modificar los marcadores relacionados con pluripotencia, además de aumentar la proliferación, la migración y la invasión de las células circundantes *in vitro*. Igualmente, los resultados *in vivo* demuestran que al inocular exosomas que derivan de células que sobreexpresan *CXCR4* en ratones inmunodeprimidos, incrementa el tamaño del tumor primario y su potencial metastásico. Asimismo, la relevancia clínica de dicho estudio indica que el análisis comparativo de los ARNms contenidos en los exosomas aislados del plasma de pacientes con cáncer de mama, revelan una firma molecular altamente enriquecida en ciertos mensajeros incluidos en los exosomas que proceden de pacientes con un pronóstico más desfavorable.

SUMMARY

Breast cancer is a complex and heterogeneous disease, and one of the most frequent causes of cancer-related deaths in developed countries. The process involves the acquisition of a malignant phenotype and it is characterized by accelerated and uncontrolled proliferation of normal mammary epithelial cells. Breast cancer cells can be carried in the bloodstream or lymphatic system to other parts of the body. Cancer stem cells are a subpopulation of cells in the tumour that are involved directly in metastatic process. Cancer cells with high pluripotentiality have one property, self-renewal. Moreover, cancer stem cells possess characteristics associated with the ability to give rise to all cell types found in a particular cancer sample and they need a specific microenvironment to develop and contribute to the growth of both primary and secondary metastatic tumours. The CXCL12/CXCR4 signalling axis is known to be involved in cancer stem cells migration. Finally, cancer stem cells play crucial roles in chemotherapy resistance and to overcome the intrinsic apoptosis. It is likely that the metastasis growth capacity is related to the enabling environment in the target organ, being chosen those organs pre-aconditioned, or maybe the primary tumour generates these conditions through remote mechanisms in which intercellular communication mediated by exosomes could be involved. Cancer cells efficiently transfer exosome contents to other cell types, modifying immune response, cell growth, angiogenesis and metastasis.

This study analyse the release of exosomes from breast tumor cells with different capacities of stemness and metastasis, and evaluate their involvement in the capacity of generate oncogenic features in recipient cells. We design a molecular study based on several cell lines with different own abilities and those of their exosomes. Oncogenic effects of breast cancer cells-derived exosomes are evaluated *in vitro* and *in vivo* models. In addition, stemness- and metastatic-related mRNA most differentially detected in exosomes are analysed in plasma of breast cancer patients assessing its capacity as a prognosis marker.

Breast cancer cells overexpressing *CXCR4* show an increase in stemness-related markers, and in proliferation, migration and invasion capacities. Furthermore, recipient cells treated with exosomes from *CXCR4*-cells show increased in the same abilities. Moreover, inoculation of *CXCR4*-cell-derived exosomes in immunocompromised mice stimulate primary tumor growth and metastatic potential. Comparison of nucleic acids contained into exosomes isolated from patients reveal a “stemness and metastatic” signature in exosomes of patients with worse prognosis. Finally, our data support the view that cancer cells with stem-like properties show concomitant metastatic behavior, and their exosomes stimulate tumor progression and metastasis. Exosomes-derived nucleic acids from plasma of breast cancer patients are suitable markers in the prognosis of such patients.

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS, 29	
INTRODUCCIÓN, 33	
1. ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER, 35	
2. CÁNCER DE MAMA, 37	
2.1. BIOLOGÍA Y DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA, 37	
2.2. ¿QUÉ ES EL CÁNCER DE MAMA? EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO, 38	
2.3. HETEROGENEIDAD DEL CÁNCER DE MAMA, 40	
2.4. CAPACIDAD METASTÁSICA E INVASIVA EN EL CÁNCER DE MAMA. CAPACIDAD STEM, 44	
2.5. FACTORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LA CAPACIDAD METASTÁSICA E INVASIVA. CXCR4 Y NICHOPREMETASTÁSICO, 46	
3. VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO MEDIADORES DE LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR, 48	
3.1. DESCRUBRIMIENTO DE LOS EXOSOMAS, 50	
3.2. BIOGÉNESIS DE LOS EXOSOMAS, 52	
3.3. COMPOSICIÓN MOLECULAR DE LOS EXOSOMAS, 53	
3.4. SECRECIÓN DE LOS EXOSOMAS, 55	
3.5. FUNCIÓN DE LOS EXOSOMAS, 56	
3.6. POTENCIAL Y APLICABILIDAD DE LOS EXOSOMAS, 58	
OBJETIVOS, 61	
MATERIAL, 65	
1. PACIENTES Y MUESTRAS HUMANAS, 67	
1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES, 67	
2. LÍNEAS CELULARES DE MAMA, 69	
3. RATONES INMUNODEPRIMIDOS, 70	
MÉTODOS, 71	
1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DE LÍNEAS CELULARES Y DEL PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA, 73	
1.1. AISLAMIENTO DE LOS EXOSOMAS, 73	
1.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET), 73	
1.3. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS EXOSOMAS, 74	
1.4. MARCAJE Y VISUALIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS AL INCORPORARSE EN LAS CÉLULAS DIANA, 74	
2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL, 75	
3. INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT), 75	
4. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE TUMOR PRIMARIO, DE CÉLULAS EN CULTIVO Y DE EXOSOMAS, 77	
5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA, 78	
5.1. SÍNTESIS DE ADNc POR RETROTRANSCRIPCIÓN (RT), 78	
5.2. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qRT-PCR), 78	
5.3. PCR ARRAYS, 81	
5.4. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS PCR ARRAYS, 81	
6. CULTIVO CELULAR, 82	
7. CREACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES MEDIANTE TRANSFECCIÓN LENTIVIRAL, 82	
7.1. TRANSFECCIÓN ESTABLE, 82	
7.2. SELECCIÓN DE CÉLULAS TRANSFECTADAS DE FORMA ESTABLE, 83	
8. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHK), 83	
9. CITOMETRÍA DE FLUJO, 84	
10. EXPERIMENTOS IN VITRO, 85	
10.1, 85	
10.2. MIGRACIÓN CELULAR, 86	
10.3. INVASIÓN CELULAR, 87	
11. EXPERIMENTOS IN VIVO, 87	
11.1. XENOTRASPLANTES TUMORALES, 87	
11.2. MODELO ORTOTÓPICO CON TRATAMIENTO DE EXOSOMAS BIOLUMINISCENCIA IN VIVO Y EX VIVO, 89	
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS, 91	
RESULTADOS, 93	
DISCUSIÓN, 124	
CONCLUSIONES, 136	
BIBLIOGRAFÍA, 140	
ANEXO I, 160	
ANEXO II, 164	

Índice de Figuras

Figura 1. Capacidades adquiridas por las células malignas necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral, 35

Figura 2. Estructura del tejido mamario normal, 37

Figura 3. Biogénesis y secreción de exosomas, 58

Figura 4. Análisis de la pluripotencialidad de las tres líneas de carcinoma de mama, 95

Figura 5. Las células transfectadas con CXCR4 muestran un incremento en la expresión de marcadores asociados con metástasis y pluripotencia, 96

Figura 6. Las células transfectadas con CXCR4 muestran un incremento en la expresión de marcadores asociados con TEM y pluripotencia, 97

Figura 7. La expresión de CXCR4 modifica la proliferación, la migración y la invasión, 98

Figura 8. La expresión de CXCR4 ejerce un efecto sobre la capacidad tumorigénica de las células de cáncer de mama, 101

Figura 9. Caracterización de los exosomas liberados por los modelos celulares, 103

Figura 10. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 modifican la capacidad de pluripotencia, 105

Figura 11. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 modifican la proliferación, la migración y la invasión, 106

Figura 12. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 incrementan el potencial oncogénico, 108

Figura 13. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 incrementan el potencial oncogénico, 109

Figura 14. Imágenes representativas mediante microscopía confocal de los ganglios linfáticos, 110

Figura 15. Los exosomas aislados del plasma de pacientes con cáncer de mama presentan marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis, 113

Figura 16. Asociación de la expresión de marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas, 114

Figura 17. Asociación de la expresión de marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas, 115

Figura 18. Asociación de la expresión de marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas, 116

Figura 19. Asociación de la expresión de marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas, 117

Figura 20. Asociación de la expresión de marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas, 118

Figura 21. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas con una peor evolución clínica, 119

Figura 22. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas con una peor evolución clínica, 121

Índice de Tablas

Tabla I. Descripción del porcentaje de distribución (N%) de las 173 pacientes con cáncer de mama, 68

Tabla II. Descripción del porcentaje de distribución de las 173 pacientes con carcinoma de mama según los distintos tipos de tratamiento, 68

Tabla III. Panel de líneas celulares humanas epiteliales de mama, 70

Tabla IV. Anticuerpos y diluciones utilizadas para la inmunotransferencia de proteínas específicas de los exosomas, 77

Tabla V. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para el estudio de PCR cuantitativa a tiempo real, 80

Tabla VI. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las líneas celulares, 82

Tabla VII. Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo, 85

Tabla VIII. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 están enriquecidos en ARNms, 111

Tabla IX. Asociación de la expresión de marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas, 114

Tabla X. Asociación de la expresión de marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas, 116

Tabla XI. Asociación de la expresión de marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas, 118

Tabla XII. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas, 120

Tabla XIII. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas, 120

Tabla XIV. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas, 121

Tabla XV. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas. Correlaciones estadísticas, 122

Tabla XVI. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas. Correlaciones no estadísticas, 123

CLAVE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCL2	Del inglés, <i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1	Del inglés, <i>Breast Cancer Type 1</i>
BRCA2	Del inglés, <i>Breast Cancer Type 2</i>
CDs	Células dendríticas
CK	Citoqueratina
CM	Cáncer de mama
CSCs	Células madre tumorales (del inglés, <i>Cancer Stem Cells</i>)
CXCR4	Del inglés, <i>C-X-C Chemokine Receptor Type 4</i>
E-Cadherina	Del inglés, <i>Ephitelial Cadherin Type 1</i>
EGFR	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ESCRT	Del inglés, <i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
FBS	Del inglés, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
GPCRs	Del inglés, <i>G Protein-Coupled Receptors</i>
HER2	Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
HOXC6	Del inglés, <i>Homeobox C6</i>
HSP	Del inglés, <i>Heat Shock Proteins</i>
HTR7	Del inglés, <i>5-hydroxytryptamine receptor 7</i>
IARC	Del inglés, <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confianza
IHQ	Inmunohistoquímica
ILVs	Del inglés, <i>Intraluminal Vesicles</i>
LBPA	Ácido lisobisfosfatídico
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MMP	Metaloproteinasas de matriz (del inglés, <i>Matrix Metalloproteinases</i>)
MTT	Agente 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MVs	Microvesículas
MVBs	Del inglés, <i>Mulivesicular Bodies</i>

MVEs	Del inglés, <i>Multivesicular Endosomes</i>
NEUROD1	Del inglés, <i>Neuronal Differentiation 1</i>
PBS	Del inglés, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real (del inglés, <i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
SCs	Células madre (del inglés, <i>Stem Cells</i>)
SG	Supervivencia Global
SDF1	Del inglés, <i>Stromal Cell-Derived Factor 1</i>
SDHA	Succinato deshidrogenasa A (del inglés, <i>Succinate Dehydrogenase Complex Subunit A</i>)
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SNAREs	Del inglés, <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Fusion Attachment Protein (SNAP) Receptors</i>
TEM	Transición Epitelio Mesénquima
TGF	Factor de Crecimiento Transformante Beta 1 (del inglés, <i>Transforming growth factor beta 1</i>)
TNM	Tamaño tumoral, número de ganglios afectados y presencia o no de metástasis
TP53	Del inglés, <i>Tumor Protein P53</i>
TP63	Del inglés, <i>Tumor Protein P63</i>
WHO	Del inglés, <i>World Health Organization</i>

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos. Presenta una alta heterogeneidad y variabilidad de un paciente a otro. Las células cancerosas a diferencia de las células circundantes del tejido sano, presentan un crecimiento continuo e incontrolado, pueden dar lugar a metástasis, pérdida de diferenciación y ofrecen resistencia farmacológica. La pérdida generalizada del control del crecimiento que muestran las células tumorales es el resultado neto de la acumulación secuencial de alteraciones genéticas y epigenéticas en múltiples sistemas reguladores de la célula, y se refleja en varios aspectos del comportamiento celular que diferencian a las células cancerosas de sus equivalentes sanas (Muñoz, 2004).

Tanto a nivel fenotípico como genético, el desarrollo del cáncer se considera un proceso multietapa constituido por la mutación y selección de aquellas células con una capacidad cada vez mayor de proliferación y replicación ilimitada, supervivencia, resistencia a las señales apoptóticas, invasión, desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir del lecho vascular preexistente (angiogénesis), diseminación a órganos distantes y adaptación al nuevo microambiente (metástasis), reprogramación del metabolismo energético y evasión del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011) (**Figura 1**).

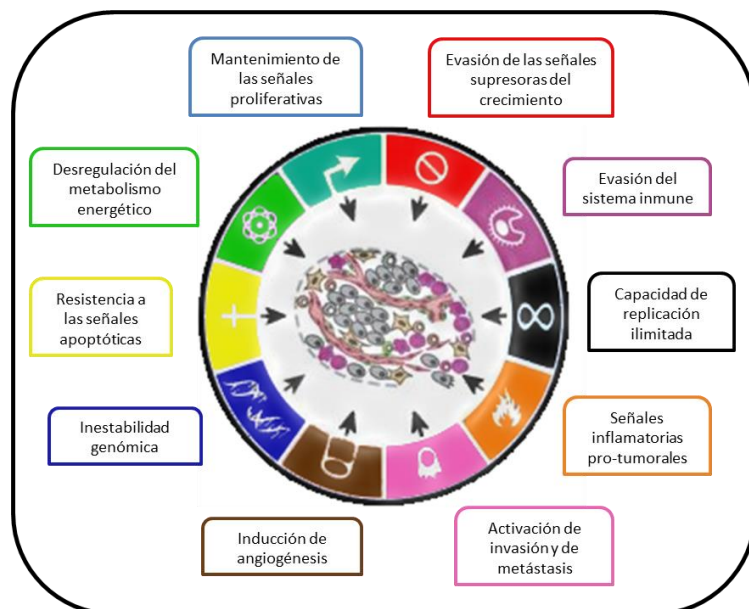


Figura 1. Capacidades adquiridas por las células malignas necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral (adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011).

El primer paso del proceso, la **iniciación** del tumor, se considera que se debe a una alteración genética que provoca la proliferación anormal de una única célula. La proliferación celular da lugar a una población clonal de células tumorales. El segundo paso es el proceso de **promoción** que proporciona un ambiente favorecedor de la supervivencia (inmortalización) y/o la estimulación selectiva de la proliferación de las células iniciadas en un tejido u órgano dado, respecto a las células normales. La tercera y última fase del desarrollo tumoral comienza cuando, una vez establecido de forma irreversible el modelo focal de proliferación celular típico durante la fase de promoción, uno o más de esos focos preneoplásicos sufre alteraciones adicionales que resultan en la expresión del fenotipo maligno. Algunas de estas mutaciones confieren una ventaja selectiva a la célula, como por ejemplo, un crecimiento más rápido, y los descendientes de las células que portan dicha mutación dominarán en la población tumoral (Cooper y Hausman, 2015). La adquisición por las células neoplásicas de la capacidad de invadir el resto del tejido diana e incluso metastatizar a otros tejidos u órganos, es la característica del proceso de **progresión** tumoral con mayor impacto a nivel clínico (<http://www.aecc.es>).

Las alteraciones genéticas pueden producirse espontáneamente como resultado de las limitaciones existentes en los mecanismos de replicación y reparación del ADN, heredarse de los progenitores y/o ser causadas por factores carcinogénicos endógenos (hormonales o productos del metabolismo celular) y/o exógenos (entre ellos, tabaco, alcohol, contaminantes de los alimentos, radiaciones, contaminación ambiental, exposiciones ocupacionales o infecciones causadas por determinados virus). El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta con la edad, probablemente debido a la acumulación de alteraciones en el ADN por exposición continuada a distintos factores de riesgo y por la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular de perder eficacia con la edad (World Cancer Report, 2008).

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad y el número total de casos está aumentando en todo el mundo. Se prevé que, a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 45% entre 2007 y 2030 (pasará de 7,9 millones a 11,5 millones de defunciones), debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población. Se estima que durante el mismo periodo el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11,3 millones en 2007 a 15,5 millones en 2030. En 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes. En resumen y teniendo en cuenta ambos sexos, el cáncer de pulmón tiene una incidencia del 13% y una mortalidad del 19,4%, siendo el cáncer de mama el de

mayor prevalencia a 5 años (19%) (Informe GLOBOCAN 2012, IARC 2014, <http://www.globocan.iarc.fr>). En la mayor parte de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa principal de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares, y los datos epidemiológicos muestran el comienzo de esta tendencia en el mundo menos desarrollado, en particular en los países «en transición» y países de ingresos medianos, por ejemplo en América del Sur y Asia. Más de la mitad de los casos de cáncer se registran ya en países en desarrollo.

2. CÁNCER DE MAMA

2.1. BIOLOGÍA Y DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

Las mamas son unas glándulas exocrinas complejas que en número par se encuentran en la pared del tórax, por encima del músculo pectoral. Están rodeadas de tejido celular subcutáneo y se sitúan ocupando el espacio existente entre la 1ª y la 6ª costilla.

La mama está formada por tejido glandular, tejido adiposo y tejido conjuntivo. El tejido glandular está constituido por 15 a 20 lóbulos repletos de alvéolos y formados por células secretoras que vierten su contenido en unos conductos excretores, que se comunican con otros denominados galactóforos; están rodeados de células contráctiles y se unen para abrirse en el pezón. Éste a su vez se halla rodeado por la aréola, un anillo cutáneo muy pigmentado. Entre los lóbulos glandulares hay tejido adiposo, que proporciona mayor o menor volumen a la mama, y entre éste hay tejido conjuntivo, que forma haces fibrosos que se extienden desde la epidermis al parénquima (ligamentos de Cooper) (**Figura 2**).

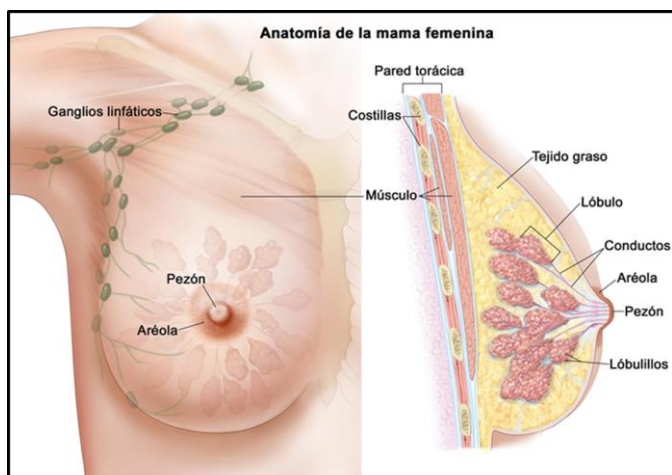


Figura 2. Estructura del tejido mamario normal. Anatomía de la glándula mamaria humana. Cada glándula mamaria contiene entre 15-20 lóbulos, cada lóbulo presenta series de ductos ramificados que drenan el pezón (Thibodeau y Patton, 2007).

Existen dos tipos de epitelio en la glándula mamaria: luminal y basal. El epitelio luminal forma los ductos, lóbulos y alvéolos secretorios, mientras que el epitelio basal consiste esencialmente por células mioepiteliales. Estos dos tipos de epitelio forman una estructura de bicapa simple que se embebe en el estroma graso (Watson y Khadel, 2008).

A diferencia de otros tejidos y órganos que son estructurados durante la embriogénesis, y que preservan su arquitectura durante toda la vida del organismo, la glándula mamaria tiene una serie de cambios en su morfología durante las distintas etapas del desarrollo. Existen tres fases principales en el desarrollo de la glándula mamaria: embrionaria, pubescente y adulta. Las hormonas (estrógenos y progesterona) y los factores de crecimiento juegan un papel importante en las diferentes etapas del desarrollo de la glándula mamaria y también están implicados en cáncer de mama (Escudero *et al.*, 2010).

2.2. ¿QUÉ ES EL CÁNCER DE MAMA? EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El cáncer de mama (CM) es una enfermedad compleja y heterogénea que consiste en la adquisición de un fenotipo maligno y una proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular. Las células del cáncer de mama pueden diseminarse a través de la sangre o de los vasos linfáticos y llegar a otras partes del cuerpo. Allí pueden adherirse a los tejidos y crecer formando metástasis.

El CM es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia en la mujer y la segunda causa de muerte por cáncer. En Estados Unidos, Canadá y países de Europa septentrional es más frecuente que con respecto a zonas de Asia, América Latina y África.

En el año 2008, se diagnosticó CM en un total aproximado de 332.000 mujeres en la Unión Europea. En España se diagnostican unos 26.000 casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los cánceres del sexo femenino en nuestro país. La incidencia de la enfermedad se ha incrementado de forma importante en las últimas décadas, de manera que el riesgo de desarrollar CM a lo largo de la vida es de un 12,2% (una de cada ocho mujeres) (WHO, *World Health Organization*, 2014).

La supervivencia por CM ha mejorado notablemente en los últimos 20 años gracias a las mejoras en el tratamiento y a la detección más temprana. Anualmente se incrementa la

supervivencia por este tumor un 1,4%. Cada año se dispone de una mayor información para diagnosticar precozmente y tratar el CM, lo que ha permitido que la supervivencia global a los cinco años del diagnóstico de dicho tumor sea del 89,2% en nuestro país (EUROCORE-5), por encima de la media europea y similar a los países con las mejores cifras de supervivencia.

Por otro lado, las tasas de mortalidad por esta neoplasia ajustadas a la edad se han mantenido constantes. El riesgo de muerte por CM a lo largo de la vida es de un 3,6% (una de cada 282 mujeres). La relativa constancia de la mortalidad, a pesar del aumento de la incidencia, se debe a la mejora en los programas de detección precoz y en el manejo terapéutico de las enfermas. El CM también puede darse en hombres, pero es poco frecuente, representando menos del 1% de todos los cánceres de mama (Senkus *et al.*, 2013; <http://www.cancer.gov>).

El CM constituye un importante problema de salud en España, tanto por su elevada incidencia y mortalidad, como por sus repercusiones físicas, psicológicas y económicas en la población. A pesar de los avances diagnósticos y terapéuticos, su pronóstico sigue dependiendo principalmente de la extensión de la enfermedad en el momento de la detección. De ahí que el conseguir un diagnóstico precoz siga siendo la mejor vía para mejorar sus posibilidades de curación (<http://www.globocan.iarc.fr>).

Hoy en día, no está claro por qué se produce el CM. Se han identificado algunos factores de riesgo. Un factor de riesgo es cualquier variable que incrementa la probabilidad de tener una enfermedad, en este caso cáncer, pero no es suficiente ni necesario para causarlo por sí solo. La mayoría de los CM necesitan estrógenos para desarrollarse, es decir, sin los estrógenos dejan de crecer o crecen más despacio. De ahí que, con algunas excepciones, los factores de riesgo para el CM estén ligados a los estrógenos. Los factores de riesgo más estudiados asociados al CM son múltiples: envejecimiento, factores genéticos (genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *EGFR*, *ERBB2*, *STK11/LKB1*, *ATM*, *PTEN*, *MLH1*, *MLH2*, *CHEK-2*, *BRIP1* y *PALB2*), sexo femenino, antecedentes familiares de cáncer de mama, antecedentes personales de cáncer de mama, menarquia precoz y menopausia tardía, disminución de la actividad física, nuliparidad, edad del primer hijo tardía, exposición a estrógenos y progesterona a lo largo de la vida, antecedentes de ciertas enfermedades mamarias benignas (hiperplasia lobular atípica e hiperplasia ductal atípica), ingesta de grasas, alcohol, tabaco, exposición a radiaciones ionizantes y factores geográficos y sociales. A pesar de lo descrito, el 80% de los casos de CM

se desarrollan en mujeres en las que no se observa relación con factores de riesgo (<http://www.seom.org>).

2.3. HETEROGENEIDAD DEL CÁNCER DE MAMA

El CM es un grupo de enfermedades heterogéneas que muestran una variación sustancial en sus características clínicas y moleculares.

2.3.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA. SUBTIPOS MORFOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS

El CM se clasifica morfológicamente en función de su patrón de crecimiento y del grado de diferenciación celular, que condicionan el tipo y el grado histológico tumoral. Clásicamente, se han estudiado los tumores en función de sus características histológicas, distinguiendo los diferentes tipos que se comentan más adelante.

El grado histológico tumoral se define según el grado de diferenciación del tejido tumoral. El sistema de Nottingham es la escala actual internacionalmente aceptada para la clasificación del grado tumoral. Surgió de la modificación del sistema de Scarff-Bloom-Richardson (Rakha et *al.*, 2010) y valora tres parámetros morfológicos: i) grado de formación glandular o tubular; ii) pleomorfismo nuclear; iii) cuantificación de mitosis.

En función de estos tres parámetros, los tumores se clasifican en tres grupos: i) Grado 1: Bien diferenciado; ii) Grado 2: Moderadamente diferenciado; iii) Grado 3: Pobremente diferenciado.

El CM se origina anatómicamente en la unidad terminal ducto-lobulillar de la glándula mamaria. Cuando el proceso de malignización se dirige en dirección al conducto se origina el Carcinoma Ductal. Cuando se dirige hacia el lobulillo, el resultado es el Carcinoma Lobulillar.

A) Carcinoma *in situ* o no infiltrante

Se llama así a la proliferación celular maligna que ocurre en el interior del conducto mamario sin traspasar la membrana basal del mismo, esto es, sin invasión o infiltración del tejido (estroma) que lo rodea. Se denomina: a) Carcinoma ductal *in situ* o carcinoma

intraductal si es dentro de un ducto; b) Carcinoma lobulillar *in situ* si es dentro de un lobulillo. Hace años, se consideraba una lesión premaligna, sin embargo en la actualidad, se entiende como un marcador que identifica a mujeres con mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama invasivo. El término más adecuado es el de neoplasia lobular.

La incidencia del Carcinoma ductal *in situ* ha aumentado en los últimos años. Este tipo de tumor se manifiesta, frecuentemente, como multicéntrico (varias lesiones en la misma mama) y bilateral (afectación de ambas mamas).

B) Carcinoma infiltrante o invasivo

Se llama así a la proliferación celular maligna que traspasa la frontera natural anatómica del ducto o el lobulillo, atravesando la membrana basal e invadiendo el tejido circundante. Fundamentalmente, existen seis tipos de cáncer de mama invasivo: a) Carcinoma ductal infiltrante de tipo convencional: se origina en las células que revisten los conductos galactóforos (conductos por donde circula la leche hacia el pezón). Es el tipo más frecuente, representando entre el 70-80% de los cánceres infiltrantes de mama; b) Carcinoma lobulillar infiltrante: se origina en las células de los lobulillos mamarios, donde se produce la leche. Su incidencia es mucho menor, constituye solamente del 5 al 10% de los carcinomas de mama; c) Carcinoma medular: representa del 1 al 5% y se observa en mujeres más jóvenes que la media de edad en los carcinomas convencionales. Sin embargo, se observan con una frecuencia desproporcionada en las mujeres portadoras del gen *BRCA1*, entre las que representa el 13% de carcinomas de mama; d) Carcinoma coloide (mucinoso): esta variante infrecuente (1 a 6% de todos los carcinomas) suele afectar a mujeres de edad avanzada y crece lentamente en el transcurso de muchos años; e) Carcinoma tubular/cribiforme: en la actualidad ha incrementado su frecuencia y supone hasta el 6% de los carcinomas con un tamaño menor de 1 cm; f) Carcinoma papilar infiltrante: los carcinomas infiltrantes con una arquitectura papilar son infrecuentes y representan menos del 1% de todos los carcinomas infiltrantes.

En resumen, el carcinoma ductal infiltrante sin otra especificación es el tipo histológico más frecuente de CM y abarca entre el 70-80% de todos los casos.

El segundo tipo histológico en frecuencia es el carcinoma lobulillar infiltrante, que representa entre el 5-15% de los casos. Otros tipos de CM menos frecuentes son el medular, el coloide y el tubular.

C) Carcinoma inflamatorio de mama

Las células tumorales infiltran los vasos linfáticos y la piel. La mama aparece globalmente enrojecida y caliente, como si estuviese inflamada, porque las células tumorales bloquean los vasos linfáticos de la piel. La incidencia es baja, entre el 1-3% de todos los cánceres de mama (Lombardía *et al.*, 2001).

2.3.2. CLASIFICACIÓN CLÍNICO/MOLECULAR. SUBTIPOS MOLECULARES. PRONÓSTICO

La clasificación histológica actual del CM no siempre refleja el pronóstico de la enfermedad y presenta escaso impacto en las decisiones terapéuticas. Tumores histológicamente similares pueden tener pronóstico y respuesta terapéutica diferentes, hecho que puede explicarse por sus diferencias moleculares. Durante los últimos años, se han desarrollado tecnologías que han permitido el análisis molecular de los tumores a nivel de genoma completo, facilitando la comprensión de su comportamiento biológico y pronóstico e individualizar su tratamiento. Hasta el momento, la mayor parte de estos análisis se han realizado usando los denominados *microarrays* o micromatrices, aunque más recientemente están siendo abordados mediante la secuenciación masiva (Dawson *et al.*, 2013).

La clasificación molecular de los tumores de mama mejor establecida y con mayor repercusión traslacional hasta la fecha, es la derivada de su patrón de expresión génica mediante el uso de *arrays* de expresión. La contribución fundamental de los *arrays* de ADNc al estudio del cáncer de mama ha sido desvelar la complejidad de los tipos histológicos tradicionales, así como contribuir a la hipótesis que plantea que el cáncer mamario no es una simple enfermedad derivada de un único progenitor. El primer estudio de los tumores de mama a través de *arrays* de expresión efectuado por Perou y colaboradores reveló la estratificación molecular de los tumores de mama en cinco subtipos reproducibles con diferentes características biológicas, resultados clínicos y respuesta a la quimioterapia (Perou *et al.*, 2000). Tres de los grupos fueron negativos para la expresión del receptor de estrógenos (RE): (i) tumores *Basal-like* o triple negativo, es decir, son estrógeno, progesterona y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) negativos. Además, se caracterizan por la expresión de *EGFR/HER1* (del inglés, *EGFR*, *Epidermal Growth Factor Receptor*), p63, CK-5/6 (CK, del inglés, *cytokeratin*), CK-14 y CK-17; (ii) tumores que sobreexpresan *HER2* (también denominados *ErbB2*) y genes relacionados; y (iii) los tumores *Normal breast-like* que expresan genes de células adiposas y no adiposas. Por otro lado, otros dos grupos de tumores fueron

positivos para la expresión del RE: (iv) tumores *Luminal A*, con altos niveles de expresión de marcadores epiteliales, tales como E-cadherina, CK-8, CK-18 y CK-19; y (v) *Luminal B*, con un diferente nivel de expresión del RE y una tasa de proliferación más elevada (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001; Sorlie *et al.*, 2003). Los subgrupos moleculares se han ampliado incluyendo actualmente un sexto grupo denominado *Claudin-low* (RE-, RP-, ErbB2-), de mal pronóstico y que se caracteriza por la baja expresión de los genes *tight junction* (proteínas que participan en las uniones estrechas) y por la alta expresión de los genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (en adelante, TEM) (Herschkowitz *et al.*, 2011; Prat *et al.*, 2015).

Desde un punto de vista clínico e histopatológico, esta enfermedad heterogénea, se clasifica en tres grupos terapéuticos básicos. El grupo de tumores que se caracteriza por ser positivos para la expresión del RE, siendo el más numeroso y diverso. Por otro lado, se encuentra el grupo de tumores que presentan amplificación de *HER2*, cuya caracterización constituyó un gran éxito clínico debido a la efectividad de la terapia dirigida a la sobreexpresión de *HER2*. Por último, los tumores de mama triple negativo se caracterizan por perder la expresión del RE, la del receptor de progesterona (RP) y carecer de amplificación y sobreexpresión de *HER2*. Como consecuencia, se define un tipo de tumores que tan solo tienen la opción de tratarse con quimioterapia y que, además, tienen una gran incidencia en portadores de mutaciones germinales en *BRCA1* (Sorlie *et al.*, 2003). Se han establecido diferencias en términos de pronóstico y tratamiento para cada subtipo, resaltándose el hecho de que los tumores triple receptor negativo presentan un pronóstico desfavorable y/o resistencia a la quimioterapia (Oakman *et al.*, 2010).

Desde la revolución molecular del CM iniciada por Perou y colaboradores se han desarrollado múltiples estudios para profundizar en el perfil genético del CM. En 2012, el grupo de Carlos Caldas (Curtis *et al.*, 2012) publicó una nueva clasificación molecular que distingue 10 subtipos de CM, denominados *IntClust* (del inglés, *Integrative Clusters*), que pueden resumirse en varios grupos en función de su pronóstico: i) *IntClust 2*: grupo de mal pronóstico constituido por tumores positivos para el RE, incluyendo el grupo de tumores *Luminal A* y *Luminal B*; ii) *IntClust 3* y *4*: grupos con mejor pronóstico caracterizados por baja inestabilidad genómica; iii) *IntClust 1, 6, 7, 8* y *9*: grupos con pronóstico intermedio constituidos principalmente por tumores que expresan RH; iv) *IntClust 5*: grupo representado por los tumores *HER2+* y que presentan mal pronóstico; v) *IntClust 10*: grupo constituido

mayoritariamente por tumores *Basal-like*, con mal pronóstico a corto plazo, pero que mejora tras los 5 años de seguimiento (Dawson *et al.*, 2013).

El panel de inmunohistoquímica (en adelante, IHQ) más adecuado para definir los subtipos moleculares es un tema de actualidad sobre el que se están elaborando numerosos estudios. Prat y colaboradores publicaron la cuantificación de la expresión de los RP como factor discriminatorio entre los subtipos *Luminal A* y *Luminal B* (Prat *et al.*, 2013; Prat *et al.*, 2015).

2.4. CAPACIDAD METASTÁSICA E INVASIVA EN EL CÁNCER DE MAMA. CAPACIDAD STEM

El cáncer de mama metastásico es una enfermedad que clínicamente presenta manifestaciones muy variables de acuerdo a su localización y gravedad. Las pacientes con cáncer de mama en las que se detecta la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico constituyen aproximadamente entre el 5-6%, pero una proporción mucho mayor de pacientes (30%) con enfermedad localizada de inicio presentarán diseminación metastásica a lo largo de la evolución de su enfermedad (IARC, WHO, 2014). En la mayor parte de los casos, la localización de la metástasis es en el hueso, aunque también son frecuentes las metástasis en partes blandas y órganos como pulmón o hígado.

La característica distintiva de las células que componen los tumores malignos es su capacidad de invadir los tejidos adyacentes, diseminarse y dar lugar a focos metastásicos en otros lugares del organismo. El desarrollo de metástasis requiere que las células tumorales completen una cascada de acontecimientos constituida por etapas bien definidas que implican interacciones muy diversas entre las células tumorales y el organismo hospedador. Algunas de estas células serán capaces de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), abandonar el tumor primario, experimentar la TEM, atravesar la matriz extracelular que las rodea (invasión), alcanzar el torrente circulatorio (intravasación), sobrevivir en el mismo y abandonarlo atravesando las paredes de capilares localizados en lugares distantes del organismo (extravasación), invadir nuevamente la matriz extracelular y establecer en la nueva localización un tumor secundario (colonización). Finalmente, este tumor secundario requerirá la formación de nuevos vasos sanguíneos que le permitan crecer y diseminar sus células para dar lugar a la aparición de nuevas metástasis (micro- y macrometástasis). Todo esto se lleva a

cabo mientras las células metastásicas escapan del sistema inmune y sobreviven a los ambientes adversos (Gupta y Massagué, 2006; Redig y McAllister, 2013).

La TEM se caracteriza por ser un conjunto complejo y coordinado de cambios moleculares, que conducen a modificaciones en el comportamiento celular (Kalluri y Weinberg, 2009). La TEM es un proceso altamente conservado cuya activación aberrante en las células tumorales se relaciona con la progresión del tumor y la formación de metástasis (McInnes *et al.*, 2015; Ferrao *et al.*, 2015). La TEM que se produce durante el proceso metastásico se origina cuando las células tumorales epiteliales abandonan el tumor primario y migran a un nuevo órgano o tejido, lo que conlleva un cambio de fenotipo desde célula epitelial a célula mesenquimal, que se traduce en pérdida de adhesión celular, aumento en movilidad e invasividad, y resistencia a apoptosis. En el caso del cáncer de mama y del cáncer colorrectal existe una asociación entre el incremento de marcadores mesenquimales (vimentina, fibronectina y N-cadherina) y la inducción del proceso metastásico (Yu *et al.*, 2013), respondiendo en una menor medida al tratamiento (Creighton *et al.*, 2009; Ferrao *et al.*, 2015).

Estudios actuales sugieren que las células que experimentan una TEM adquieren propiedades de célula madre (Mani *et al.*, 2008; Morel *et al.*, 2008; Pietilä *et al.*, 2016). Las células madre existen en muchos tejidos somáticos diferentes, y están implicadas de manera importante en su fisiología. Las células madre poseen tres propiedades características: (i) autorrenovación, (ii) capacidad de diferenciarse en varias líneas, y (iii) un potencial de proliferación ilimitado. La capacidad de autorrenovarse es especialmente significativa, ya que la modificación aberrante de dicha propiedad en combinación con el potencial de crecimiento intrínseco de las células madre explican, en gran parte, lo que se considera un fenotipo maligno (Jordan *et al.*, 2006; Takebe e Ivy, 2010; Martín-Belmonte y Pérez-Moreno, 2012). Numerosos estudios han demostrado que las características específicas de las células madre son relevantes en algunos tipos de cáncer (células iniciadoras de tumor): leucemia mieloide aguda (Lapidot *et al.*, 1994; Dick y Lapidot, 2005), cerebro (Singh *et al.*, 2003), colon (Singh *et al.*, 2004), mama (Al-Hajj *et al.*, 2003; Wicha *et al.*, 2007; Loricó y Rappa, 2011), pulmón (Eramo *et al.*, 2008), páncreas, próstata, melanoma y glioblastoma (Al-Hajj *et al.*, 2003). Las células malignas con estas propiedades funcionales se han denominado células madre tumorales (CSCs, del inglés, *Cancer Stem Cells*) (Wicha *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2010; Clevers *et al.*, 2011).

Diversos grupos han aportado importantes evidencias de que las células madre del cáncer de mama están localizadas y son similares a las células madre de tejido mamario (Lynch *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007). Usando marcadores celulares de tejido mamario y separando las células mediante citometría de flujo, es posible identificar a la célula madre tumoral mamaria como células CD44+/CD24-. Sólo un pequeño porcentaje de las células de un tumor de mama tiene este fenotipo capaz de transferir el cáncer mamario en un ratón inmunodeficiente (Al-Hajj *et al.*, 2003).

Las células tumorales secretan al medio circundante una gran cantidad de moléculas (TGF- β , TGF- α , PDGF, MMPs, etc) que estimulan los distintos tipos de células que constituyen el microambiente. A su vez, las células del estroma responden mediante la producción de factores de crecimiento (VEGF-A), **quimioquinas** (CXCL12), citoquinas (IL-6), proteasas (MMPs) y moléculas de adhesión (integrina 4) (Koshida *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008). Como consecuencia, se origina una comunicación autocrina y paracrina que induce la proliferación de las células tumorales, la angiogénesis, eludir la muerte celular, la remodelación de la matriz extracelular, el reclutamiento de células inflamatorias, la invasión y la metástasis (Hoshino *et al.*, 2015). El **eje CXCL12/CXCR4** está implicado en la progresión del tumor incluyendo angiogénesis, metástasis y supervivencia (Furusato *et al.*, 2010; Teicher y Fricker, 2010).

2.5. FACTORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LA CAPACIDAD METASTÁSICA E INVASIVA. CXCR4 Y NICHOS PREMETASTÁSICOS

Las quimioquinas son una familia de proteínas de bajo peso molecular (8-12 kDa) con capacidad atrayente y proinflamatoria que actúan sobre distintas poblaciones leucocitarias. Su clasificación está basada en criterios funcionales, por lo que se distinguen las quimioquinas homeostáticas e inflamatorias (Zlotnik y Yoshie, 2000). Las quimioquinas homeostáticas son expresadas constitutivamente en tejidos específicos, donde participan en la activación y migración de distintas poblaciones leucocitarias para organizar la arquitectura de los órganos linfoides. Por el contrario, las quimioquinas inflamatorias participan en procesos inflamatorios y su producción es inducida por estímulos proinflamatorios. El factor derivado de células de estroma-1 (*SDF-1*, del inglés, *stromal cell-derived factor 1*), también conocido como CXCL12, es una quimioquina de la familia CXC que regula la quimiotaxis de leucocitos (Baggiolini, 1998), la diferenciación de linfocitos T (Sallusto *et al.*, 1998), participa en neovascularización (Zou *et al.*, 1998) y en el reclutamiento de precursores osteoclastos (Kortesidis *et al.*, 2005). CXCL12 es

esencial para el desarrollo del corazón, gónadas, sistema nervioso y vasos sanguíneos, ya que ratones con deleciones del gen *Cxcl12* mueren durante el periodo perinatal por defectos en hematopoyesis (Zou *et al.*, 1998). Los receptores de CXCL12 son CXCR4 y CXCR7, presentando un amplio patrón de expresión en los tejidos de mamíferos. CXCL12 y CXCR4 participan en numerosas funciones, tales como el tráfico de linfocitos, la hematopoyesis y el desarrollo fetal (Zou *et al.*, 1998; Doitsidou *et al.*, 2002). También tienen un papel muy activo en patologías como el cáncer (Müller *et al.*, 2001; Clézardin, 2011), infección por VIH (Bleul *et al.*, 1996), y enfermedades autoinmunes (Hansen *et al.*, 2006).

CXCR4 es una proteína integral con 7 dominios transmembrana que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (*GPCRs*, del inglés, *G Protein-Coupled Receptors*), siendo uno de los 19 receptores de quimioquinas conocidos en humanos. Es activado exclusivamente por la quimioquina CXCL12. CXCR4 juega un papel esencial en el tráfico de células madre durante la embriogénesis, la organogénesis, la hematopoyesis, la vascularización y la regeneración de tejidos y órganos (Wysoczynski *et al.*, 2005; Furusato *et al.*, 2010). Los ratones deficientes en CXCR4 tienen un fenotipo letal con defectos en la linfopoyesis de las células B, en la mielopoyesis, en la vascularización del tracto gastrointestinal, en la formación cardíaca del *septum* ventral, y en el desarrollo del cerebelo (Furusato *et al.*, 2010). CXCR4 ha sido asociado con más de 23 tipos de cáncer donde tiene un papel fundamental en metástasis, angiogénesis, y en la supervivencia del tumor (Müller *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Benovic y Marchese, 2004; Orimo *et al.*, 2005; Kucia *et al.*, 2005; Schimanski *et al.*, 2008; Teicher y Fricker, 2010; Yagi *et al.*, 2011; Cojoc *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

Descrito por primera vez en el año 2001 su papel clave en la progresión de la metástasis, CXCR4 está altamente expresado en células tumorales de mama en humanos y en tumores metastásicos. Las células de cáncer de mama que expresan este receptor metastatizan de forma muy agresiva en órganos secundarios, donde la expresión de CXCL12 está significativamente incrementada. De la misma manera, la expresión de SDF-1 en las células del estroma tumoral recluta progenitores endoteliales para la angiogénesis (Müller *et al.*, 2001), además de estimular la proliferación y la supervivencia de las células tumorales mediante una señal paracrina (Domanska *et al.*, 2013).

Según todo lo comentado, es fundamental conocer los mecanismos implicados en el desarrollo del complejo proceso de metástasis, ya que es posible que la capacidad de crecimiento esté relacionada con un adecuado microambiente en el órgano diana, siendo elegidos aquellos órganos con un acondicionamiento preexistente (nicho premetastásico), o bien que el tumor primario lo genere utilizando mecanismos a distancia en los que podría estar implicada la comunicación intercelular mediada por exosomas. Diversos estudios han descrito que existe una implicación funcional de los exosomas liberados por las células de un tumor con el microambiente que las rodea y en la especificidad organotrópica (Peinado *et al.*, 2011; Peinado *et al.*, 2012; Costa-Silva *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2015; Hoshino *et al.*, 2015; Zhang y Wang, 2015).

3. VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO MEDIADORES DE LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR

En los organismos pluricelulares, la comunicación célula-célula es un mecanismo fundamental de intercambio de información fisicoquímica muy importante durante el desarrollo embrionario, y que contribuye de manera significativa al mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto. Un tipo de vía de comunicación intercelular es por contacto directo de célula a célula, otra modalidad es la referida a moléculas de superficie que se agrupan y contactan directamente con otras células o la matriz extracelular, y el último a destacar es el que se origina a través de la producción de moléculas solubles como factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, citoquinas y quimioquinas. Estas moléculas son liberadas por las células a su entorno próximo, se unen a receptores de otras células induciendo una señalización intracelular y, como consecuencia, modifican el estado fisiológico de la célula diana (Antonyak y Cerione, 2014).

Hasta hace relativamente poco tiempo, sólo se conocían estos tipos principales de vías de comunicación intercelular. Sin embargo, en las últimas décadas, diversos grupos de investigación han descrito otro tipo de mensajeros que participan activamente en la comunicación a distancia entre células (Théry *et al.*, 2006; Simons y Raposo, 2009; Mittelbrunn y Sánchez-Madrid, 2012). Dichos mediadores son esferas o vesículas de pequeño tamaño rodeadas de una membrana lipídica (Cocucci *et al.*, 2009; Théry *et al.*, 2009), liberadas al medio extracelular por diferentes tipos celulares, procedentes tanto de organismos eucariotas como procariotas (Colombo *et al.*, 2014). Originalmente se pensaba que las vesículas

extracelulares (en adelante, VEs) eran simplemente un artefacto, producto del daño celular, cuya única función era la de permitir a la célula eliminar sus desechos (Chatterjee y Kim, 1977; De Broe *et al.*, 1977). Sin embargo, en la actualidad se sabe que los distintos tipos de vesículas extracelulares, incluyendo ectosomas, micropartículas, nanovesículas, argosomas, prostasomas, tolerosomas, oncosomas y exosomas (Kim *et al.*, 2014; Lo Cicero *et al.*, 2015), son importantes mediadores de la comunicación intercelular que se produce en una gran variedad de procesos biológicos, llevando a cabo importantes funciones que afectan a las células receptoras de una manera muy compleja (Pant *et al.*, 2012; Mittelbrunn y Sánchez-Madrid, 2012; El Andaloussi *et al.*, 2013).

Las vesículas extracelulares se han podido aislar a partir de un amplio abanico de fluidos biológicos, tales como plasma (Caby *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012; Soldevilla *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2015), orina (Conde-Vancells *et al.*, 2010; Hessvik *et al.*, 2013; Øverbye *et al.*, 2015), saliva (Ogawa *et al.*, 2011; Lässer *et al.*, 2011a), efusiones tumorales (André *et al.*, 2002), secreción nasal (Lässer *et al.*, 2011b), leche materna (Admyre *et al.*, 2007; Lässer *et al.*, 2011a), calostro (Hata *et al.*, 2010), líquido amniótico (Asea *et al.*, 2008), fluido luminal uterino (Griffiths *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2013), líquido ascítico (Bretz *et al.*, 2013; Tokuhisa *et al.*, 2015), líquido cefalorraquídeo (Chiasserini *et al.*, 2014), líquido sinovial (Skriner *et al.*, 2006; György *et al.*, 2012), lavado broncoalveolar (Admyre *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2014), excrementos (Koga *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013), lágrimas (Kalluri, 2016), bilis (Dutta *et al.*, 2015) y semen (Vojtech *et al.*, 2014).

El término vesícula extracelular es amplio. El origen, la naturaleza, las características físicas y las funciones biológicas son muy diversas, presentando distintos nombres en la literatura según se refieran a su tamaño (utilizando el prefijo micro- o nano-: micropartículas, microvesículas (MVs), nanovesículas, nanopartículas), a su origen celular o tisular (dexosomas, texosomas, prostasomas, oncosomas), según sus funciones biológicas (vesículas matriciales calcificantes, argosomas, tolerosomas) y, por último, en base a la vía de secreción (usando el prefijo exo- o ecto-: ectosomas, exosomas, exovesículas, vesículas exosomas-like) (Colombo *et al.*, 2014).

En la actualidad, existe una clara evidencia del destacado papel que desempeñan las vesículas extracelulares en numerosos contextos biológicos (respuesta inmune, lactancia, neurobiología, microbiología, etc.) y, al mismo tiempo, sigue aumentando el interés por

clarificar su contribución en muchas patologías humanas (cáncer, enfermedades autoinmunes, desórdenes neurodegenerativos, VIH, etc.) y, por tanto, desarrollar su potencial biotecnológico (Gould y Raposo, 2013; Yuana *et al.*, 2013).

3.1 DESCUBRIMIENTO DE LOS EXOSOMAS

La nomenclatura para definir los distintos tipos de vesículas extracelulares es, actualmente, materia de debate por la comunidad científica. No obstante, se utilizan tres términos de un modo más genérico. En primer lugar, los **cuerpos apoptóticos** con un tamaño superior a 1000 nm de diámetro y que se caracterizan por contener fragmentos de ADN y proteínas nucleares asociadas al mismo (Mittelbrunn y Sánchez-Madrid, 2012). En segundo lugar, los **ectosomas** (denominados también *shedding vesicles*, micropartículas o microvesículas (MVs)) que presentan un tamaño variable entre 100-1000 nm, formándose directamente en la membrana plasmática protruyendo al espacio extracelular (Benito-Martín *et al.*, 2015). En tercer lugar, los **exosomas** con un tamaño comprendido entre los 30 y los 150 nm de diámetro y de origen endosomal (György *et al.*, 2011; Baietti *et al.*, 2012; Abels y Breakefield, 2016).

Inicialmente, el término “exosoma” designaba a aquellas vesículas con un tamaño entre 30 y 1000 nm, liberadas por una gran variedad de células con el fin de transportar las ecto-enzimas de la membrana de las que ellas mismas querían desprenderse y con actividad 5'-nucleotidasa (Trams *et al.*, 1981). A mediados de los 80, dos grupos de investigación, uno a cargo del Dr. P. Stahl y el otro a cargo del Dr. RM. Johnstone, observaron por primera vez los exosomas mientras estudiaban la maduración de los reticulocitos a eritrocitos, describiendo que dichas células liberaban al exterior el receptor de la transferrina (RTf) a través de numerosos cuerpos vesiculares de 50 nm aproximadamente (Harding *et al.*, 1983; Pan *et al.*, 1985). No fue hasta unos años más tarde donde este hito se confirmó, y se comenzó a utilizar de manera más concreta el término “exosoma” para definir a las vesículas membranosas de pequeño tamaño (<150 nm), con un origen endosomal, liberadas al medio extracelular por exocitosis y aisladas mediante centrifugación a 100.000xg durante 90 minutos (Johnstone *et al.*, 1987).

Una década más tarde se reanudó el interés sobre el campo de los exosomas, publicándose, por primera vez, que éstos podrían ser importantes mediadores en la

comunicación intercelular, en lugar de meros transportadores de moléculas de desecho. Raposo y colaboradores demostraron que los linfocitos B transformados por el virus Epstein-Barr secretaban vesículas de origen endocítico que transportaban moléculas fundamentales para la respuesta inmune: dímeros de péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (en adelante, CMH) de clase II unidos a péptidos antigénicos (Raposo *et al.*, 1996). Dos años más tarde, Zitvogel y colaboradores avanzaron un paso más, demostrando que las células dendríticas (CDs) también eran capaces de liberar exosomas con péptidos CMH promoviendo una respuesta antitumoral en ratones (Zitvogel *et al.*, 1998). Todos estos resultados descritos aportan las bases para considerar a los exosomas como partícipes activos en la comunicación célula-célula (Chaput y Théry, 2011). Desde entonces, se ha descrito que tanto líneas celulares establecidas como cultivos primarios liberan exosomas en condiciones *in vitro*: células epiteliales intestinales (van Niel *et al.*, 2001), neuronas (Fauré *et al.*, 2006), células madre mesenquimales (Lai *et al.*, 2010), fibroblastos (Zhang *et al.*, 2006), reticulocitos (Johnstone *et al.*, 1987), CDs (Chaput *et al.*, 2006), células T (Turiák *et al.*, 2011), células B (Vallhov *et al.*, 2011), células de Schwann (Fevrier *et al.*, 2004) y, células tumorales (Wolfers *et al.*, 2001; Hegmans *et al.*, 2004; Abusamra *et al.*, 2005; Riches *et al.*, 2014) entre otras.

La mayor parte de los estudios con exosomas se han llevado a cabo con células de mamíferos. Sin embargo, este tipo de microvesículas han sido descritas en otras especies tales como: reticulocitos de aves (Pan y Johnstone, 1983), leucocitos de salmón (Iliev *et al.*, 2010), *Leishmania major* (Silverman *et al.*, 2010), tripanosomas (Clayton y Estévez, 2011), veneno de serpiente (Ogawa *et al.*, 2008), *Drosophila* (Greco *et al.*, 2001), hongos (Nosanchuk *et al.*, 2008), e incluso en bacterias (Nevot *et al.*, 2006).

En el año 2007 ocurre el segundo hito importante, cuando el grupo de J. Lötvald demuestra que los exosomas transportan, además de lípidos y proteínas, ARN mensajero (en adelante, ARNm) y ARNs de pequeño tamaño (del inglés, *microRNAs* o *miRNAs*) en su interior. También describen que algunos ARNm pueden ser traducidos a proteínas (Valadi *et al.*, 2007). Este hecho ha sido muy relevante en cuanto a que el ARNm presente en los exosomas es capaz de regular la expresión génica en las células receptoras (Skog *et al.*, 2008; Nolte-‘t Hoen *et al.*, 2012).

En los últimos años ha tenido lugar el tercer hito significativo, ya que se ha descrito que los exosomas, y el resto de vesículas extracelulares, presentan como parte de su

contenido ADN mitocondrial, ADN de hélice sencilla y ADN de doble hélice (Guescini et al., 2010; Balaj et al., 2011; Thakur et al., 2014; Lee et al., 2014). El significado fisiológico referido a que las vesículas extracelulares contengan ADN es aún desconocido, pero nos alienta a continuar desarrollando el gran potencial clínico de los exosomas.

3.2. BIOGÉNESIS DE LOS EXOSOMAS

Los exosomas son generados en los cuerpos o endosomas multivesiculares (*MVBs*, del inglés, *multivesicular bodies* o *MVEs*, multivesicular *endosomes*) como vesículas intraluminales (*ILVs*, del inglés, *intraluminal vesicles*), y liberados por la fusión de los primeros con la membrana plasmática (Simons y Raposo, 2009). La formación de los endosomas multivesiculares implica la segregación del contenido de los futuros exosomas sobre una región de la membrana endosomal y la posterior invaginación de vesículas de tamaño variable hacia el lumen de un endosoma temprano. A diferencia de los *MVEs* destinados a la degradación en el lisosoma, aquellos que se fusionarán con la membrana plasmática presentan una composición lipídica diferente, enriquecida en colesterol. Sin embargo, existen evidencias de que la misma maquinaria involucrada en la formación de *MVEs* que irán hacia el lisosoma (ruta degradativa), también participa en la formación de los *MVEs* destinados a exocitosis (ruta exocítica). El mecanismo de direccionamiento de las proteínas hacia los *MVEs* se encuentra muy conservada, y se organiza en cuatro complejos multiproteicos denominados complejos clasificadores endosomales responsables del transporte o *ESCRT*-0, -I, -II y -III (*ESCRT*, del inglés, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). Los primeros tres reconocen proteínas de membrana ubiquitinadas, secuestrándolas en la membrana endosomal, al tiempo que *ESCRT*-III se encarga de la formación y escisión de las *ILVs* (Vidal et al., 1997; de Gassart et al., 2003). Se ha visto que la depleción de ciertos miembros de estos complejos lleva a una disminución de la formación de exosomas en distintos tipos celulares, con lo que se los ha asociado a la formación de los *MVEs*, si bien es posible que la selección de las proteínas destinadas a exosomas no dependa únicamente de la ubiquitinación (Yáñez-Mó et al., 2015). Mecanismos independientes de *ESCRT* han sido propuestos para la formación de *MVEs* en ciertos tipos celulares. Uno de estos involucra a la enzima esfingomielinasa, encargada de la producción de ceramida, la cual se encuentra en grandes cantidades en los exosomas. Asimismo, las tetraspaninas, también muy abundantes en los exosomas, han sido asociadas con la formación de *ILVs* (Raposo y Stoorvogel, 2013; Shifrin et al., 2013). No se cuenta aún con

una descripción completa de los mecanismos por los cuales se generan los *MVEs*, tanto dependientes como independientes de *ESCRT*, y cuanta colaboración existe entre ellos.

Debido a su origen endosomal, los exosomas tienen un tamaño comprendido entre los 30 y los 150 de diámetro y una densidad de flotación de 1,13-1,19 g/mL en gradiente de sacarosa (Hess et al., 1999; Théry *et al.*, 2006; Mathivanan et al., 2010; van der Pol et al., 2012; Akers et al., 2013; Cocucci y Meldolesi, 2015; Miller y Grunewald, 2015). Están enriquecidos en proteínas derivadas de la membrana plasmática, de la vía endocítica y del citosol, aunque también pueden contener pequeñas cantidades de proteínas del aparato de Golgi, del retículo endoplasmático, de la mitocondria y del núcleo (Théry *et al.*, 2001; Osteikoetxea *et al.*, 2016).

3.3. COMPOSICIÓN MOLECULAR DE LOS EXOSOMAS

El avance en las técnicas “ómicas”, genómicas y proteómicas, ha permitido incrementar la capacidad para identificar nuevos elementos moleculares implicados en la biología de los exosomas. La composición molecular, así como el contenido, son indicativos y dependen tanto de su origen como del estado fisiológico de la célula a partir de la cual fueron secretados (Simpson *et al.*, 2009; Taylor et al., 2011; Milane *et al.*, 2015). Sin embargo, los diversos estudios realizados revelan que existe un patrón proteico común para la mayoría de ellos (Mathivanan *et al.*, 2010). Brevemente, sus principales componentes son:

A) Proteínas

Típicamente los exosomas contienen proteínas implicadas (i) en el transporte de vesículas y en la regulación del acoplamiento y fusión de los exosomas con la membrana plasmática (por un lado la familia de las Rab GTPasas tales como Rab5a, Rab11, Rab27a, Rab27b, Rab35, también denominadas como los receptores de proteínas solubles de unión al factor sensible a N-etilmaleimida (*SNAREs*, del inglés, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein (SNAP) receptors*), y por otro las anexinas), (ii) en la biogénesis de los *MVEs* (tales como ALIX, TSG101 y clatrina), (iii) moléculas de adhesión (Mfge8, lactadherina, integrinas, y tetraspaninas tales como CD63 (TSPAN30), CD81, CD9 (TSPAN29) y CD82), (iv) chaperonas, incluyendo proteínas de choque térmico (*HSP*, del inglés, *Heat Shock Proteins*) (HSC70, HSP90), (v) enzimas metabólicas (enolasa, aldolasa, ATP citrato liasa, ácido graso sintasa), (vi) proteínas del citoesqueleto (actina, cofilina, vimentina, miosina y tubulina), (vii)

en la transducción de señales (quinasas y fosfatasa), (viii) proteínas asociadas a las balsas lipídicas (del inglés, *Lipid Rafts*) (flotilina-1), (ix) citoquinas, etc. Algunas de estas proteínas descritas (CD63, CD9, CD81, ALIX (PDCD6IP), TSG101, HSC70, Mfge8, CMH clase II) están presentes de manera específica en los exosomas, por lo que se definen como “marcadores exosomales” (Lötvall *et al.*, 2014; Bratukova y Kim, 2015; Iraci *et al.*, 2016).

B) Lípidos

En cuanto a su composición lipídica, la membrana de los exosomas está enriquecida en colesterol, esfingomielina, ácido lisobisfosfatídico (LBPA), derivados de la ceramida (*lipid rafts*) que exponen en la cara externa de la bicapa fosfatidilserina (lípidos que se encuentran normalmente en la cara citoplasmática de la membrana plasmática) (de Gassart *et al.*, 2003; Morelli *et al.*, 2004; Parolini *et al.*, 2009). Los integrantes lipídicos de la membrana exosomal son similares a la membrana plasmática de la célula de la que proceden (Vidal *et al.*, 1989; Wubbolts *et al.*, 2003; Laulagnier *et al.*, 2004), en cambio, presentan una composición glucídica diferente a la célula de origen (Batista *et al.*, 2011). Diversos estudios de metabolómica sugieren que algunos tipos de lípidos están implicados o regulan la formación y la liberación de las vesículas extracelulares (Del Conde *et al.*, 2005; Llorente *et al.*, 2007). Además, los lípidos activos (eicosanoides, ácidos grasos y colesterol) pueden ser transferidos entre las células a través de las VEs (Record *et al.*, 2014). Sería necesario realizar más estudios de lipidómica de las vesículas extracelulares aisladas de diferentes tipos celulares y del gran abanico de fluidos biológicos, para esclarecer el papel de los lípidos y su implicación en la biogénesis y en las funciones de las mismas.

C) Ácidos Nucleicos

Estudios recientes han descrito que los exosomas tienen la capacidad de llevar a cabo una transferencia horizontal del material genético (ARNm y microARNs) entre células (Mittelbrunn y Sánchez-Madrid, 2012; Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Por primera vez, Valadi y colaboradores demostraron la presencia y la transferencia de ARNm y microARNs contenidos en exosomas secretados por mastocitos a células receptoras, modulando sus niveles de expresión génica ya que podían traducirse a proteínas (Valadi *et al.*, 2007). Es muy interesante el hecho de que dicho material genético se almacene selectivamente en las MVs, y éste sea funcional en las células diana. El mecanismo por el cual tiene lugar la incorporación selectiva de moléculas de ARN en las MVs aún no se conoce completamente. Es posible que existan ciertos motivos en las secuencias de los microARNs que sean reconocidos por ribonucleoproteínas, etiquetándolos con este destino (Villarroya-Beltri *et al.*, 2013).

Recientemente, se ha descrito la presencia de moléculas de ADN de doble cadena en el interior de los exosomas (Thakur *et al.*, 2014). Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia de identificar las moléculas específicas contenidas en los exosomas responsables de conferir el efecto biológico en la célula receptora.

Los resultados obtenidos en cuantiosos estudios sobre la composición molecular (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) de los exosomas se recoge en una base de datos de libre acceso denominada *ExoCarta* (Mathivanan y Simpson, 2009; Keerthikumar *et al.*, 2015; www.exocarta.org). A día de hoy, dichos datos se han ampliado y combinado con otros pertenecientes a un abanico de vesículas secretadas en un compendio (*Vesiclepedia* y/o *EVpedia*) cuyo objetivo es sentar unas bases acerca de las normas de nomenclatura y los métodos de purificación de los diferentes tipos de vesículas extracelulares (Kaira *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015; www.exocarta.org/vesiclepedia).

3.4. SECRECIÓN DE LOS EXOSOMAS

Una vez formados los *MVEs*, estos deben dirigirse hacia la periferia celular y fusionarse con la membrana plasmática para liberar su contenido y secretar los exosomas. La familia de las proteínas Rab GTPasas ejercen un papel regulador en el transporte intracelular entre los diferentes compartimentos y en la fusión de las vesículas con la membrana plasmática (Colombo *et al.*, 2014). En la línea celular de eritroleucemia K562 fue donde se describió por primera vez la proteína Rab11 como implicada en la secreción de exosomas (Savina *et al.*, 2002). Años más tarde, en oligodendrocitos (Hsu *et al.*, 2010) y en las células HeLa (Ostrowski *et al.*, 2010) se describió que las proteínas Rab35 y Rab27a/Rab27b, respectivamente, controlaban diversas etapas de la vía de secreción de exosomas. Varios estudios han descrito que una pérdida en la expresión de Rab27a y Rab27b lleva consigo una reducción del 50% en la secreción de exosomas (Lo Cicero *et al.*, 2015). Se sabe que la familia de las proteínas *SNAREs* son las encargadas de regular el paso final de la fusión de los *MVEs* con la membrana plasmática, aunque se desconoce la maquinaria celular implicada (Colombo *et al.*, 2014). La secreción de exosomas se produce de manera constitutiva, pero puede verse regulada en respuesta a distintos estímulos internos como el aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular (Stoorvogel *et al.*, 2002). La secreción de exosomas también puede ser estimulada por factores exógenos como el estrés por radicales libres (Mittelbrunn y Sánchez-Madrid, 2012), la

radiación UV (Keller *et al.*, 2007), y el descenso de la cantidad de colesterol en las membranas (Pant *et al.*, 2012).

Por último, pocos estudios se han llevado a cabo sobre la interacción de los exosomas con la célula diana receptora para así poder ejercer su función biológica. Aunque todavía el mecanismo es desconocido, se han propuesto los siguientes: (i) endocitosis mediada por receptor (Morelli *et al.*, 2004), (ii) adhesión a la superficie celular (Al-Nedawi *et al.*, 2009), (iii) fusión con la membrana plasmática (Parolini *et al.*, 2009), y (iv) fagocitosis (Feng *et al.*, 2010).

3.5. FUNCIÓN DE LOS EXOSOMAS

Según lo comentado, las vesículas extracelulares representan un importante modo de comunicación intercelular a través de la transferencia de información genética (Kosaka *et al.*, 2013). Como resultado, los exosomas secretados juegan un papel biológico fundamental en la regulación de la fisiología normal (mantenimiento de las células madre (Ratajczak *et al.*, 2006), reparación de tejidos (Gatti *et al.*, 2011), vigilancia inmunológica (Raposo *et al.*, 1996) y coagulación de la sangre (Del Conde *et al.*, 2005)), así como de los procesos patológicos a través de la regulación genética y/o a través de la programación epigenética (Zhang *et al.*, 2015).

Dependiendo de la célula o tejido de origen, diferentes funciones han sido atribuidas a los exosomas. El hallazgo de que los exosomas portan tanto antígenos como complejos estables CMH/péptido, ha despertado el interés por su posible papel modulador en la respuesta inmune. Se ha descrito que los exosomas de CDs contienen en su membrana varias proteínas que involucran la estimulación de los linfocitos T, incluyendo CMH de clase I y II y moléculas coestimuladoras como CD86; encontrando que estos exosomas inducen la estimulación de linfocitos T CD4⁺ *in vitro*, ya que las CDs maduras utilizan los exosomas de CDs como fuente de antígeno incrementando el número de CDs que llevan un péptido en particular, amplificando la respuesta inmune adaptativa (Théry *et al.*, 2002). Asimismo, los exosomas derivados de macrófagos infectados con patógenos son capaces de inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias por macrófagos que no han tenido contacto previo con dicho patógeno (Bhatnagar *et al.*, 2007). Además de moléculas de CMH, los exosomas contienen una gran cantidad de proteínas que pueden inhibir la respuesta inmune mediante diferentes mecanismos independientes de antígeno (Chaput y Théry, 2011). De esta manera,

los exosomas derivados de varias líneas tumorales son capaces de inducir la apoptosis de células T, tanto CD4⁺ como CD8⁺, a través de los ligandos FasL y TRAIL (Andreola *et al.*, 2002; Czystowska *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2011), y de la galectina-9 (Kilbi *et al.*, 2009). De la misma manera, los exosomas derivados de la placenta reducen la citotoxicidad de las células NK y CD8⁺, probablemente a través de los ligandos de NKG2 que expresan (Hedlund *et al.*, 2009). Por último, se demostró que los exosomas derivados de células tumorales de mesotelioma tienen la capacidad de disminuir la respuesta proliferativa a IL-2 en poblaciones de linfocitos (Clayton *et al.*, 2007).

Otra función de los exosomas es su implicación en el intercambio de proteínas patógenas tales como priones, péptido β -amiloide y α -sinucleína (Bellingham *et al.*, 2012; Rajendran *et al.*, 2014). Este mecanismo podría contribuir a facilitar la transmisión de las enfermedades neurodegenerativas de las que son responsables. En un contexto fisiológico, varios tipos celulares del sistema nervioso central, incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, liberan exosomas que participan en la comunicación interneuronal (Chivet *et al.*, 2014) y en el sostenimiento de la integridad de las neuronas (Fruhbeis *et al.*, 2014).

Los exosomas también participan en otros procesos biológicos como la fertilización y el desarrollo embrionario. Los prostasomas parecen jugar un papel importante en la protección del espermatozoide frente al pH ácido de la vagina, aumentando la motilidad del espermatozoide y retrasando la reacción del acrosoma (Kravets *et al.*, 2000).

Numerosos estudios han revelado la habilidad de determinados virus para utilizar la maquinaria endosomal para ser secretados a través de la membrana plasmática vía exosomas, lo que representaría una forma de evasión del sistema inmune (Novellino *et al.*, 2012; Wurdinger *et al.*, 2012; Madison y Okeoma, 2015).

En último lugar, un estudio reciente describe la importancia de los exosomas en la comunicación intercelular en la piel. Los queratinocitos de la epidermis secretan exosomas que contactan con los melanocitos vecinos modulando la pigmentación, esto es, incrementando la expresión y la actividad de las proteínas melanosomales lo que produce un aumento en la síntesis de melanina (Lo Cicero *et al.*, 2015).

3.6. POTENCIAL Y APLICABILIDAD DE LOS EXOSOMAS EN CÁNCER

El desarrollo y la progresión del cáncer dependen de las interacciones entre las células tumorales y de la relación con el microambiente tumoral que las rodea, en el que se incluyen células endoteliales, fibroblastos, pericitos, células del sistema inmune y células derivadas de la médula ósea, además de la matriz extracelular que embebe a todas ellas (Worthley *et al.*, 2010). En este complejo contexto tiene lugar una gran variedad de interacciones entre sus diversos componentes donde los exosomas determinan una serie de eventos, tales como la proliferación celular tumoral, la migración, la angiogénesis, la invasión y el potencial metastásico (Li *et al.*, 2007; Meehan y Vella, 2016) (**Figura 3**).

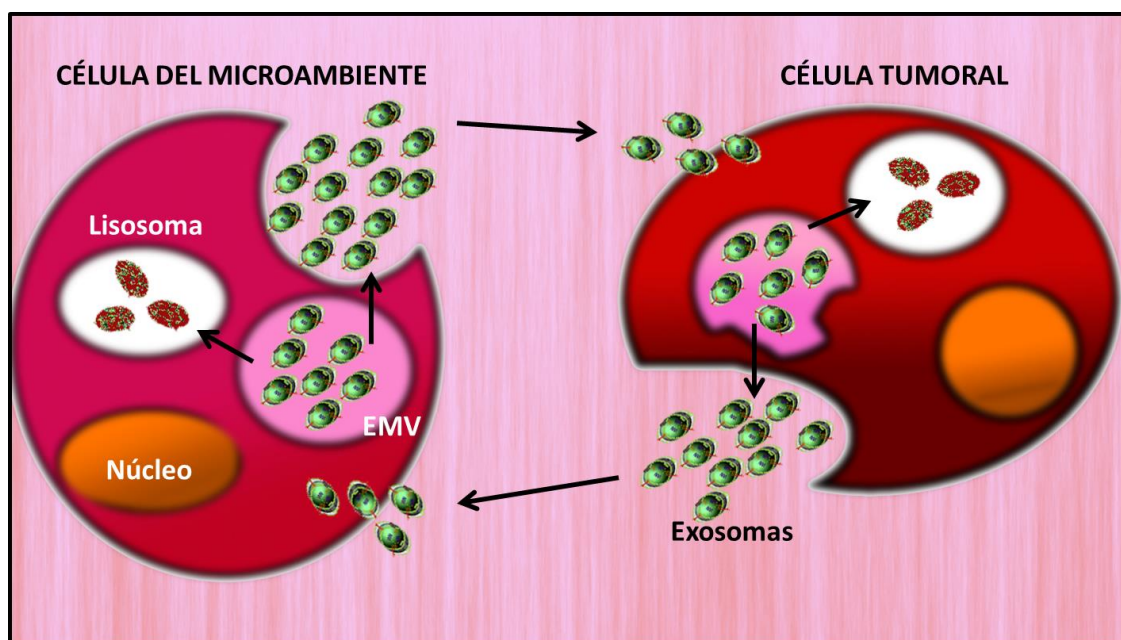


Figura 3. Biogénesis y secreción de exosomas. Comunicación intercelular entre las células tumorales y las células del microambiente tumoral. EMV, endosoma multivesicular.

Los exosomas tumorales actúan como mediadores de comunicación intercelular mediante el transporte de onco-proteínas y onco-ARNs (Ciardiello *et al.*, 2016), por lo que la búsqueda de biomarcadores en el interior de las nanovesículas circulantes en la “biopsia líquida” es fundamental para el diagnóstico y la predicción de respuesta en el tratamiento contra el cáncer (Miller y Grunewald, 2015; Heitzer *et al.*, 2015; Carvalho y Oliveira, 2015).

Los exosomas también han surgido como un candidato potencial para modalidades de inmunoterapia y vacunación, así como un nuevo vector para la terapia génica (El Andaloussi *et al.*, 2013). Existe un creciente interés en el estudio de sistemas de administración de moléculas

biológicas (exosomas) que sirven como medio de entrega de material genético, de drogas o de antígenos (Seow y Wood, 2009). Una de las finalidades de la administración de fármacos a nanoescala es mejorar los resultados terapéuticos mediante el aumento de su potencia en sitios específicos así como reducir la toxicidad sistémica (Malam *et al.*, 2009). Están siendo utilizadas partículas a nanoescala, por ejemplo, partículas recombinantes de virus, para el desarrollo de vacunas contra el cáncer debido a su eficacia en la obtención de respuestas inmunes celulares y humorales. Se ha demostrado que las nanopartículas sintéticas podrían ser conjugadas a moléculas biológicas y ser utilizadas como un sistema de suministro de una vacuna eficaz (Scheerlinck y Greenwood, 2008; Rieger *et al.*, 2009; Hood y Wickline, 2012).

OBJETIVOS

El objetivo principal de nuestro trabajo se centra en determinar si el material genético contenido en los exosomas, liberados por las células tumorales con mayor capacidad de pluripotencialidad como mecanismo de comunicación intercelular, tiene un papel favorecedor de los procesos de crecimiento, invasión local y diseminación tumoral. Los objetivos específicos diseñados para la ejecución del presente estudio son los siguientes:

1.- Aislar exosomas liberados por líneas celulares de cáncer de mama (T47D, HCC38 y MDA-MB-231) en las cuales se han descrito previamente diferentes proporciones de células pluripotentes, para:

1a- Analizar en los exosomas marcadores asociados a capacidad de pluripotencialidad y metástasis, tanto a nivel de ARNm como de receptores de superficie.

1b- Evaluar los efectos de dichos exosomas sobre células receptoras (células epiteliales de cáncer de mama con baja capacidad de pluripotencialidad y/o metastásica). Los efectos analizados serán:

- Proliferación, migración e invasión.
- Expresión diferencial de genes implicados en pluripotencia y metástasis.

2.- Comprobar si líneas celulares tumorales de mama con baja capacidad de pluripotencialidad y/o metástasis, incubadas con los exosomas portadores de los marcadores seleccionados en los objetivos previos, poseen un mayor potencial tumorigénico respecto a las células control, en un modelo de ratón inmunodeficiente.

3.- Extraer exosomas del plasma de 201 enfermas con cáncer de mama y analizar los marcadores relacionados con tumorigénesis identificados en los estudios *in vitro* descritos en los objetivos previos.

4.- Analizar en esta serie de pacientes la relación entre los niveles en plasma de los marcadores exosomales seleccionados y los parámetros clínico-patológicos de sus tumores, así como la evolución clínica incluyendo la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad.

MATERIAL

1. PACIENTES Y MUESTRAS HUMANAS

En el desarrollo del presente trabajo se utilizaron muestras de sangre (plasma) procedentes de pacientes con cáncer de mama. Dichas muestras fueron proporcionadas por el biobanco del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda (Madrid), donde tuvo lugar el diseño y la realización del proyecto. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de dicho centro. Todos los individuos fueron informados, firmando el preceptivo consentimiento antes de su inclusión en el mismo.

El estudio observacional se llevó a cabo en 201 pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama. Se incluyeron de forma secuencial pacientes de todos los estadios, y todas ellas fueron reclutadas (2008-2012), diagnosticadas, tratadas y seguidas evolutivamente en el hospital. La media de seguimiento de esta serie de pacientes fue de 73 meses (rango de seguimiento: 1-136 meses). Durante este periodo, el 21,9% de los pacientes progresaron y el 14,6% falleció.

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron tras el diagnóstico clínico de sospecha y antes de la extirpación quirúrgica, siendo retiradas del estudio si el diagnóstico no se confirmaba histológicamente. Todos los plasmas fueron procesados con el mismo protocolo, y se conservaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

Del total de pacientes reclutadas para el estudio se excluyeron 28 pacientes debido a la escasa calidad del material genético obtenido de los exosomas procedentes del plasma, por lo que los casos incluidos en el análisis final fueron 173.

1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

Los parámetros patológicos que se tuvieron en cuenta para el análisis de correlación clínico-molecular fueron los siguientes: edad, tipo histológico del tumor, tamaño del tumor, número de adenopatías axilares infiltradas, presencia de metástasis al diagnóstico, estadio patológico, estado de receptores esteroideos, el marcador de proliferación Ki67, sobreexpresión de c-erb-B2, p53 y bcl2, tratamiento recibido, recaída, supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) (**Tabla I**).

	EDAD		IVL		BILATERAL		TAM. TUMORAL		AFEC. GANG.		GRADO			RE		Rp	
	< 50 Años	≥ 50 Años	No	Sí	No	Sí	≤ 2 cm	> 2 cm	No	Sí	I	II	II	negativo	positivo	negativo	positivo
N (%)	34.7	65.3	64.9	35.1	97.7	2.3	52.7	47.3	57.7	42.3	21.9	38.1	40	21.7	78.3	28.7	71.3

	HER2		p53		Ki67		Bcl2		ESTADIO		RT		RECAÍDA		ESTADO ACTUAL		
	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	I, II, IIIA	IIIB, IV	R	NR	No	Sí	Sin	Con	Exitus
N (%)	73.6	26.4	69.9	30.1	30.3	69.7	24.7	75.3	84	16	98.1	1.9	78	22	76.6	4.1	19.3

Tabla I. Descripción del porcentaje de distribución (N%) de las 173 pacientes con cáncer de mama que constituyen el estudio en función de las distintas características clínico-patológicas. IVL, invasión vascular y linfática; Tam. Tumoral, tamaño del tumor; Afec. Gang., afectación ganglionar; RE, estado del receptor de estrógenos; RP, estado del receptor de progesterona; RT, respuesta al tratamiento (R, respuesta; NR, no respuesta); Estado Actual (Sin, vivo sin enfermedad; Con, vivo con enfermedad, *Exitus*, muerte).

El estadio se elaboró según el sistema de estadificación TNM que valora la combinación del tamaño del tumor (T), la afectación de los ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis (M). El estado de receptores esteroideos, la expresión de Ki67, p53 y bcl2 se determinaron por inmunohistoquímica. C-erb-B2 se estudió también por inmunohistoquímica y en aquellos casos con resultados dudosos, se realizó un análisis por hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Las pacientes seleccionadas finalmente para el estudio fueron seguidas clínicamente tras el diagnóstico y el tratamiento, realizando revisiones clínicas cada 3 meses durante el primer año desde el final del tratamiento, y cada 6 meses durante el segundo y tercer año y, posteriormente, anual. En cada revisión y junto con la exploración clínica, las pacientes se sometieron a determinaciones hematológicas y bioquímicas, radiografía de tórax, estudio

isotópico óseo (semestral el primer año) y mamografía contralateral anual, así como exploraciones específicas según sintomatología clínica.

El tratamiento sistémico administrado consistió en quimioterapia, en base a adriamicina y ciclofosfamida, hormonoterapia con tamoxifeno o inhibidores de aromatasa y terapia dirigida con el anticuerpo monoclonal anti-HER2. En la **Tabla II** adjunta se observa la distribución de las pacientes en los distintos tratamientos.

TRATAMIENTO								
	CIR	CIR+QT	CIR +RT	CIR +HT	CIR +QT+HT	CIR+QT+RT	CIR+RT+HT	CIR+QT+RT+HT
Porcentaje (%)	8,8	6,5	5,3	24,1	14,7	6,5	14,7	19,4

Tabla II. Descripción del porcentaje de distribución de las 173 pacientes con carcinoma de mama que constituyen el estudio según los distintos tipos de tratamiento. CIR, cirugía; QT, quimioterapia; RT, radioterapia; HT, hormonoterapia.

Al final del estudio se analizaron la tasa de recaídas, el periodo libre de enfermedad y la supervivencia global (valorable para aquellas pacientes que tuvieran un seguimiento igual o superior a 5 años), considerando la SLE al periodo de tiempo que abarca desde el momento del diagnóstico hasta la fecha de la primera recaída, y la SG al periodo de tiempo desde el diagnóstico hasta la última revisión o fallecimiento del paciente.

2. LÍNEAS CELULARES DE MAMA

Con el objeto de establecer los modelos celulares idóneos en los que desarrollar los estudios funcionales, se seleccionó un panel de líneas celulares de mama en las que se caracterizaron la capacidad de pluripotencialidad y la capacidad de metástasis. En la **Tabla III** adjunta se detallan las características y procedencia de las líneas celulares utilizadas.

Línea celular	Subtipo ⁽¹⁾	RE ⁽²⁾	RP ⁽³⁾	HER2 ⁽⁴⁾	Procedencia ⁽⁵⁾	Proveedor (Referencia) ⁽⁶⁾
HCC38	Basal	-	-	-	CPD	ATCC
MDA-MB-231	Basal	-	-	-	AC	ATCC
T47D	Luminal	+	+	-	CD	ATCC

Tabla III. Panel de líneas celulares humanas epiteliales de mama. ⁽¹⁾Subtipo de cáncer de mama del que proceden las líneas celulares. ⁽²⁾Receptor de Estrógenos, ausencia (-) o presencia (+) de expresión. ⁽³⁾Receptor de Progesterona, ausencia (-) o presencia (+) de expresión. ⁽⁴⁾Receptor de crecimiento epidérmico 2, (-) no sobreexpresión de HER2. ⁽⁵⁾Tipo de tumor de mama del que se estableció la línea celular, AC: adenocarcinoma, CD: carcinoma ductal, CPD: carcinoma primario ductal. Información extraída de las fichas técnicas de las líneas celulares disponibles en <http://www.atcc.org>. ⁽⁶⁾Líneas procedentes de la ATCC (Manassas, VA, USA).

3. RATONES INMUNODEPRIMIDOS

En los ensayos de tumorigenicidad se emplearon ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} hembra de 5 semanas de edad (*Harlan Laboratories*, Barcelona, España). Estos ratones se caracterizan por presentar una mutación autosómica recesiva en el locus *nu* del cromosoma 11, aplasia en el timo y pérdida de pelo. Su deficiencia en células T hace que sean un modelo excelente para la inoculación de células tumorales humanas sin que se produzca el rechazo de las mismas.

MÉTODOS

1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DE LÍNEAS CELULARES Y DEL PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

1.1. AISLAMIENTO DE LOS EXOSOMAS

Las distintas líneas celulares se sembraron a una densidad de 6×10^6 células en sus correspondientes medios de cultivo suplementados con un 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés, *Fetal Bovine Serum*) (Biowest SAS, Nuaillé, France) durante 72 horas, al que previamente se le habían deplecionado los exosomas por filtración y ultracentrifugación. Transcurrido el tiempo de incubación se recogieron los medios y, a continuación, se procedió a aislar los exosomas a partir de los sobrenadantes celulares mediante una primera centrifugación a 500xg durante 10 minutos a una temperatura de 4°C para eliminar los restos celulares. Seguidamente, se realizó una segunda centrifugación a 17.000xg durante 20 minutos a 4°C para descartar cuerpos apoptóticos y vesículas de mayor tamaño. Después, se llevó a cabo un paso de filtración con un filtro (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) de tamaño de poro de 0,22 µm de fluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés, *Polyvinylidene Fluoride*). En último lugar, los exosomas se sedimentaron mediante una ultracentrifugación a 120.000xg durante 90 minutos a 4°C en la ultracentrífuga Optima™ MAX-XP (Beckman Coulter Inc., Barcelona, Spain). El sedimento de exosomas obtenido se resuspendió en un volumen de 200 µL de tampón fosfato salino (PBS, del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*) o, en su caso, en medio de cultivo con un 1% de FBS sin exosomas.

Los exosomas de la serie de plasmas de pacientes con cáncer de mama se aislaron a partir de 500 µL de volumen mediante el kit comercial ExoQuick™ plus Thromboplastin D Kit (System Bioscience Inc., Mountain View, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Todas las muestras de exosomas resultantes se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

1.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

Este análisis se realizó en colaboración con el Servicio de Microscopía Electrónica de Transmisión (Responsable Dr. Francisco R. Urbano) de la Facultad de Medicina (SIdI) en la Universidad Autónoma de Madrid.

Los exosomas aislados por centrifugaciones diferenciales se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 2% (v/v) y se montaron en rejillas de carbón recubiertas del polímero formvar. Después se realizó una post-fijación en glutaraldehído al 1% (v/v) Tras los lavados, las rejillas se contrastaron con oxalato de uranilo al 2% (v/v) y se embebieron en una mezcla de acetato de uranilo al 0,4% (v/v) y metilcelulosa al 1,8% (v/v). Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión *JEOL JEM1010* (JEOL Ltd.), empleando un voltaje de trabajo de 100 kV. El análisis de las muestras se llevó a cabo utilizando el *software* específico *DigitalMicrograph*, para la visualización y procesamiento de las imágenes.

1.3. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS EXOSOMAS

El sistema NanoSight LM10 es un equipo puntero de conteo y detección de exosomas mediante el cual se cuantificó la distribución del número y del tamaño de dichas nanovesículas de todas las muestras en estudio. Este análisis se realizó en colaboración con el Laboratorio de Comunicación Intercelular en la Respuesta Inflamatoria del Dr. Francisco Sánchez Madrid en el CNIC.

1.4. MARCAJE Y VISUALIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS AL INCORPORARSE EN LAS CÉLULAS DIANA

Para realizar la tinción de la bicapa lipídica de los exosomas, dichas nanovesículas aisladas y purificadas a partir de la línea celular T47D se marcaron con *PKH67 fluorescent cell linker kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Una vez teñidos los exosomas, se realizó un lavado con 9 mL de PBS, se sometieron a ultracentrifugación y se resuspendieron, finalmente, en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino sin exosomas. Posteriormente, 50.000 células de la línea T47D se sembraron por cuadruplicado en un portaobjetos destinado a cultivo celular (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) y, a continuación, se incubaron con 100 μ L de exosomas marcados con PKH67 durante 6 horas a

37°C. Pasado este tiempo de incubación, las células se fijaron con PFA al 4% y se lavaron dos veces con PBS. La muestra celular se incubó con el anticuerpo monoclonal de ratón frente a E-Cadherina (BD Biosciences, San Jose, CA) usando una dilución 1:20 a 4°C durante toda la noche. Finalmente se realizaron varios lavados con PBS, incubándose a temperatura ambiente con el marcador *Alexa Fluor® 546* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) a una dilución 1:1000 durante 45 minutos. El marcaje del núcleo se realizó con *TO-PRO®-3* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) a 1:1000 durante 15 minutos. Las secciones se montaron con PBS-glicerol (1:1). Por último, la identificación de los elementos celulares se realizó mediante microscopía confocal TCS SP5 (Leica Microsystems, Barcelona, Spain), adquiriendo las distintas imágenes con un escáner a una velocidad de 400 Hz y con una resolución de 1.024 píxeles. Por último, éstas se analizaron con el *software Leica Application Suite 2.02 (LAS)*.

2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Para realizar la extracción de proteína total de los exosomas una vez que éstos fueron aislados, se les añadió el buffer de digestión *T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) y un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). El lisado resultante se centrifugó a 10.000 rpm durante 7 minutos para descartar los componentes no proteicos sedimentados, y el sobrenadante se recuperó y se conservó para la posterior detección de proteínas por inmunotransferencia. La concentración de proteínas de cada muestra se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico denominado *kit Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

3. INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

Con el objetivo de determinar a nivel de proteína los marcadores de interés en los exosomas, realizamos una inmunodetección mediante *Western Blot*. Esta técnica permite la detección de proteínas específicas usando anticuerpos.

Entre 10-15 µg de proteína total procedente de cada muestra de exosomas se resuspendieron en el apropiado volumen de agente reductor y tampón de aplicación 2X

(*Loading Buffer*) y, posteriormente, se calentaron en un termobloque a 95°C durante 5 minutos antes de su aplicación en el gel. Para separar las proteínas desnaturalizadas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) con dodecilsulfato sódico (*SDS*, del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate*).

Posteriormente, las proteínas se transfirieron por *electroblotting* de los geles a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema *iBlot Western Blotting System* y los reactivos *iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) para proceder con la inmunodetección.

Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución *Odyssey Blocking Buffer* (LI-COR Biosciences, Homburg, Germany) y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes que reconocen las proteínas a estudiar, durante toda la noche a 4°C.

Tras tres lavados de 5 minutos con PBS que contenía 0,01% del detergente Tween20, las membranas se incubaron una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios apropiados para reconocer el anticuerpo primario, anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo conjugados con IRDye (colorante infrarrojo) 800 (Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA) diluidos en solución de bloqueo 1:2000.

A continuación, los restos de anticuerpo secundario se eliminaron con tres lavados de 5 minutos con PBS al 0,01% Tween20. La detección de proteínas y la intensidad de las bandas se visualizaron y cuantificaron por densitometría usando el equipo de detección de fluorescencia *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Germany). Todas las incubaciones se realizaron en agitación.

En la **Tabla IV** adjunta se especifican las características de los anticuerpos utilizados.

Antígeno	Clon	Especie	Conjugación	Dilución	Casa comercial
CD63	Monoclonal (ab59479)	Ratón	-	1:50	Abcam (Cambridge, UK)
CD81	Monoclonal (349502)	Ratón	-	1:50	BioLegend Inc. (San Diego, CA)
Calnexina	Policlonal (H-70)	Conejo	-	1:50	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)
IgG conejo	Policlonal	Burro	IRDye800	1:2000	Rockland Immunochemicals Inc. (Limerick, PA)
IgG ratón	Policlonal	Conejo	IRDye800	1:2000	Rockland Immunochemicals Inc. (Limerick, PA)

Tabla IV. Anticuerpos y diluciones utilizadas para la inmunotransferencia de proteínas específicas de los exosomas.

4. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE TUMOR PRIMARIO, DE CÉLULAS EN CULTIVO Y DE EXOSOMAS

La extracción de ARN total de las líneas celulares y de los exosomas se llevó a cabo utilizando el kit comercial de extracción *mirVanaTM miRNA Isolation Kit* (Ambion Inc., Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso del tumor primario de ratón, la extracción de ARN total se realizó con *TRIzolTM* (Bioline, Taunton, MA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Sin embargo, el primer paso fue modificado de la siguiente manera: se homogenizaron 30 mg aproximadamente de cada muestra y se disgregaron mecánicamente siguiendo las instrucciones del equipo MagNa Lyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en presencia de 800 µL de la primera solución de lisis del kit. Los siguientes pasos se mantuvieron según el protocolo.

La concentración de ARN total extraído se calculó a partir del valor de absorbancia obtenido en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE). La

calidad y pureza de las muestras se valoró mediante el ratio de las absorbancias 260/280 nm, que en todas las muestras osciló entre 1,6 y 2, valores óptimos para muestras diluidas en agua. Cada muestra fue diluida, siempre y cuando fuese posible, a una concentración de 100 ng/μL para continuar con los análisis de expresión génica.

5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

5.1. SÍNTESIS DE ADNc POR RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 400 ng de ARN total procedente de los tumores primarios y de las líneas celulares. En el caso de los exosomas, al no ser posible cuantificar la cantidad del ARN total extraído, se utilizaron 11 μL de esta extracción para la reacción de transcripción reversa.

Para todas las reacciones de retrotranscripción se utilizó el sistema *Transcription First-Strand cDNA Synthesis kit* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) y hexámeros aleatorios. Se siguieron las condiciones de la reacción estándar especificadas, así como el volumen final establecido por el fabricante. El ADNc resultante se conservó a -20°C.

5.2. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qRT-PCR)

La cuantificación de dichos genes se basó en la incorporación de un fluoróforo en las nuevas cadenas de ADN sintetizadas en cada ciclo de amplificación. La cantidad de fluorescencia obtenida en cada uno de los ciclos es equivalente a la cantidad de ADN del gen analizado en la muestra de partida. Para el marcaje se utilizó un agente intercalante de ADN de doble hebra (SYBR Green I) cuya unión a la molécula amplifica 100 veces su fluorescencia.

Todas las reacciones de PCR de este trabajo se llevaron a cabo en el equipo Light-Cycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), utilizando el kit *Light-Cycler 480 SYBR Green I Master Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). El volumen total de cada reacción fue de 20 μL e incluyó 5 μL del producto de la retrotranscripción, 10 μL de 2X Universal PCR Master Mix que contenía la polimerasa FastStart Taq DNA, así como 0,5 μM de cada uno de los cebadores (directo y reverso).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos mediante un proceso constituido entre 35 y 45 ciclos. Por último, la especificidad de cada pareja de oligonucleótidos se verificó por la curva de disociación (curva de melting) de los productos amplificados por PCR, y éstos mismos fueron secuenciados mediante un secuenciador ABI Prism 377 DNA (PE Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) para confirmar la amplificación específica de los genes deseados.

En los modelos celulares, la expresión relativa de los genes candidatos y del gen endógeno se determinó según el Ratio Relativo Normalizado = $E_T^{CpT(C)-CpT(S)} \times E_R^{CpR(S)-CpR(C)}$; donde C_p = número de ciclo, E = eficiencia, T = gen diana, R = gen de referencia, C = control, S = muestra. Dicha fórmula permite incorporar las eficiencias específicas de las reacciones de PCR tanto de los genes de interés como del gen endógeno.

Para los exosomas, los niveles de ARNm fueron normalizados con la concentración de ADNc (ng/ μ L). En los ensayos *in vitro* y experimentos en animales, el ratio se define como los niveles de expresión del gen de estudio en la línea celular o ratón modificado y/o tratado con respecto a los valores del mismo en el control correspondiente.

Para la cuantificación relativa de los genes de estudio se utilizó el gen de referencia succinato deshidrogenasa A (*SDHA*, del inglés, *Succinate Deshydrogenase Complex Subunit A*). La pareja de oligonucleótidos para el gen de referencia y las distintas parejas de cebadores diseñados para la amplificación de los genes de interés implicados en la capacidad de pluripotencia y de metástasis se especifican en la **Tabla V**.

Nombre del gen	Oligonucleótidos	Secuencia (5' - 3')
<i>SDHA</i> *	Directo	5'TGGGAACAAGAGGGCATCTG3'
	Reverso	5'CCACCACTGCTCAAATTCATG3'
<i>SNAI1</i>	Directo	5'CACTATGCCGCGCTCTTTC3'
	Reverso	5'GGTCGTAGGGCTGCTGGAA3'
<i>CDH1</i>	Directo	5'CTACACGTTACGGTGCCC3'
	Reverso	5'GTCCTTTGTCGACCGGTGC3'
<i>CXCR4</i>	Directo	5'TATGACTCCATGAAGGAACCCTGT3'
	Reverso	5'AGCCTGTAAC TTGTCCGTCATGC3'
<i>KLF4</i>	Directo	5'CAAGTCCCGCCGCTCCATTACCAA3'
	Reverso	5'CCACAGCCGTC CAGTCACAGTGG3'
<i>cMYC</i>	Directo	5'TGGATTTTTTTCGGGTAGTGG3'
	Reverso	5'TCCAGATATCTTCGCTGGG3'
<i>NANOG</i>	Directo	5'CTAAGAGGTGGCAGAAAAACA3'
	Reverso	5'CTGGTGGTAGGAAGAGTAAAGG3'
<i>OCT3</i>	Directo	5'ACTGCAGCAGATCAGCCACATCG3'
	Reverso	5'ATCCTCTCGTTGTGCATAGTCGC3'
<i>SOX2</i>	Directo	5'ACACCAATCCCATCCCACT3'
	Reverso	5'GCAAACCTCCTGCAAAGCTC3'
<i>LIN28</i>	Directo	5'CGGGCATCTGTAAGTGGTTC3'
	Reverso	5'CAGACCCTTGGCTGACTTCT3'

Tabla V. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para el estudio de PCR cuantitativa a tiempo real. *SDHA**, gen de referencia.

5.3. PCR ARRAYS

En las muestras de ARN obtenidas de los exosomas analizamos los perfiles de expresión de 84 genes relacionados con la capacidad de pluripotencialidad y 84 genes implicados en el proceso metastásico utilizando el sistema de *arrays* de qRT-PCR “*RT Profiler PCR Array*” (Qiagen, Hilden, Germany) para *Stem Cell Transcription Factors* y *Human Tumor Metastasis*, en un equipo Light-Cycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cada kit analiza con precisión los niveles de 84 secuencias de genes e incluye 5 genes de referencia y controles de contaminación por ADN genómico, calidad de ARN y de rendimiento de la qPCR. En primer lugar, se prepararon las muestras a analizar realizando la retrotranscripción y la posterior preamplificación del ADNc usando el kit “*RT² PreAMP cDNA Synthesis*” (Qiagen, Hilden, Germany) específico para cada PCR *array*. A continuación se llevó a cabo el PCR *array*, cargando una alícuota de cada muestra preamplificada junto con la reacción mezcla que contenía, entre otros, la polimerasa FastStart DNA y SYBR Green I en cada uno de los 96 pocillo de la placa del PCR *array*. Seguidamente, se llevó a cabo una PCR cuantitativa de 40 ciclos (*Light-Cycler 480 Real-Time PCR System*). Finalmente, la variación en los niveles de los ARNms evaluados entre dos muestras se determinó calculando el ratio entre la expresión relativa del gen en cada una de ellas de acuerdo a la ecuación: $2^{-(Ct \text{ muestra de interés} - Ct \text{ muestra control})}$, siendo Ct el ciclo de amplificación.

5.4. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS PCR ARRAYS

Para validar los resultados de los PCR *arrays* se seleccionaron una serie de genes y se diseñaron los oligonucleótidos específicos. Previamente, se realizó una preamplificación de las muestras a validar usando el kit *Real-Time Ready cDNA PreAMP Master* con los *PreAMP Primer Pools*, para su posterior evaluación utilizando los paneles *Real-Time Ready Custom Panels* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en un aparato Light-Cycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6. CULTIVO CELULAR

Todas las líneas celulares seleccionadas en las que se llevaron a cabo los diferentes ensayos funcionales desarrollados en el estudio fueron cultivadas a 37°C, en una atmósfera humidificada (95%) y con un 5% de CO₂. De forma rutinaria se descartó contaminación por *Mycoplasma* utilizando el sistema *Mycoplasma Plus*TM PCR Primer Set (Stratagene, Agilent Technologies Inc., CA).

A continuación, se detallan las condiciones específicas que se utilizaron para el crecimiento de cada una de ellas (**Tabla VI**).

Medio de cultivo	Suplementos	Línea celular
RPMI-1640	10% FBS, 2 mM L-glu, 100 U/mL P, 100 ng/mL E, 0,25 µg/mL F	T47D, T47D-vv, T47D-CXCR4, HCC38
DMEM	10% FBS, 2 mM L-glu, 100 U/mL P, 100 ng/mL E, 0,25 µg/mL F	MDA-MB-231, MDA-MB-231-vv, MDA-MB-231-CXCR4, MDA-MB-231 ^{FLuc}

Tabla VI. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las líneas celulares. FBS, suero fetal bovino; L-glu, glutamina; P, penicilina; E, estreptomicina; F, fungizona; vv, vector vacío. El medio DMEM, el medio RPMI-1640, la penicilina, la estreptomicina y la L-glutamina se obtuvieron de Lonza (Barcelona, Spain). La fungizona se obtuvo de Roth (Navarra, Spain). El suero fetal bovino se obtuvo de Biowest SAS (Nuaillé, France).

7. CREACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES MEDIANTE TRANSFECCIÓN LENTIVIRAL

7.1. TRANSFECCIÓN ESTABLE

Para la determinación del papel oncogénico de *CXCR4* se valoró el efecto de la sobreexpresión del mismo mediante transfección lentiviral de las líneas celulares T47D y MDA-MB-231, seleccionadas previamente como modelos experimentales.

Tras llevar las células T47D y MDA-MB-231 a una confluencia de 50-80%, éstas se transfectaron con el vector de expresión *Precision LentiORF* (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) que contenía *CXCR4* y el gen reportero que codifica la proteína

verde fluorescente (*GFP*, del inglés, *Green Fluorescent Protein*) y con el correspondiente vector vacío RFP (del inglés, *Red Fluorescent Protein*), utilizando el reactivo *Lipofectamine 2000* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.2. SELECCIÓN DE CÉLULAS TRANSFECTADAS DE FORMA ESTABLE

Con el objeto de obtener líneas celulares que sobreexpresasen *CXCR4* de manera estable, se procedió a la selección de las células transfectadas una vez transcurridos 7 días tras la infección lentiviral.

Las células transfectadas con el vector lentiviral que contenía el ADNc de *CXCR4* o el vector vacío se seleccionaron mediante citometría de flujo (FACS Aria II, BD Biosciences, San Jose, CA), purificándose aquella población de células que expresaba la proteína verde fluorescente (GFP) o en su caso la proteína roja fluorescente (RFP). El gen codificante de esta proteína forma parte de dicho vector comercial y se pudo utilizar como marcador de la incorporación del mismo, y por lo tanto del ADNc exógeno de *CXCR4* (o del vector vacío en el caso del experimento control). A lo largo del proceso de expansión de las células seleccionadas en RPMI suplementado con un 20% de FBS, se monitorizó periódicamente en el microscopio de fluorescencia el mantenimiento de la proteína verde o roja fluorescente.

La línea celular MDA-MB-231^{FLuc} (Fernández-Periáñez *et al.*, 2013) fue cedida amablemente por el Dr. Luis Álvarez Vallina (Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid, España), la cual expresaba establemente el gen reportero de luciferasa FLuc.

8. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

La tinción IHQ en el tumor de mama de ratón se realizó sobre cortes histológicos de un grosor entre 2 y 4 µm de los bloques de parafina que se procesaron según los protocolos

estándar antes de ser incubados con el anticuerpo primario Ki67 (DAKO, Agilent Technologies, Glostrup, Denmark) durante toda la noche. La inmunodetección se realizó con la técnica estreptavidina-biotina-peroxidasa (LSA, DAKO, Agilent Technologies, Glostrup, Denmark) usando el cromógeno diaminobencidina (DAB) como sustrato. Todas las inmunotinciones se realizaron usando el dispositivo de inmunotinción automático TechMate 500 (DAKO, Agilent Technologies, Glostrup, Denmark).

La cuantificación de la expresión de Ki67 se llevó a cabo por dos observadores independientes mediante el conteo de células positivas a través de un microscopio óptico. El porcentaje de células positivas se determinó por cada 1.000 células, contadas en 5 campos de 200 células cada uno. Los casos que no exhibían tinción fueron considerados negativos.

9. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el análisis de la capacidad de pluripotencia de las líneas celulares en estudio, se evaluó la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (*ALDH*, del inglés, *Aldehyde Dehydrogenase*) mediante la tinción con el kit *ALDEFLUOR® Assay* (Stemcell Technologies, Grenoble, France), siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, para identificar las distintas subpoblaciones de las CSCs y cuantificar los niveles de marcadores de superficie relacionados con pluripotencialidad en mama ($CD44^{high}$ y $CD49f^{high}$), las células HCC38, MDA-MB-231, T47D-CXCR4 y T47D-vector vacío se incubaron con los anticuerpos monoclonales frente a CD44 y frente a CD49f (Integrina α -6) (Abcam, Cambridge, UK) conjugados con isotiocianato de fluoresceína (*FITC*, del inglés, *Fluorescein Isothiocyanate*). Se adjunta la **Tabla VII** donde se detallan las características de los anticuerpos utilizados. Todos los resultados obtenidos se analizaron mediante el citómetro de flujo MACSQuant® Analyzer (Miltenyi Biotec S.L., Madrid, Spain). Se analizaron, al menos, 10.000 eventos individuales por muestra usando el programa *MACSQuantify™ software version 2.5* (Miltenyi Biotec S.L., Madrid, Spain). Los resultados se expresaron como la intensidad media de fluorescencia (*MFI*, del inglés, *Mean Fluorescence Intensity*) específica, que se obtuvo al restar la fluorescencia inespecífica de la autofluorescencia a la total. Para determinar la autofluorescencia se analizaron células no tratadas con dichos marcadores.

Antígeno	Clon	Especie	Conjugación	Dilución	Casa comercial
CD44	Monoclonal	Rata	FITC	1:50	Abcam (Cambridge, UK)
CD49f (ITGA6)	Monoclonal	Ratón	FITC	1:50	Abcam (Cambridge, UK)
IgG ratón	Policlonal	Ratón	IRDye800	1:500	Abcam (Cambridge, UK)

Tabla VII. Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo. FITC, isotiocianato de fluoresceína.

10. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

10.1. PROLIFERACIÓN CELULAR

Para la determinación de la proliferación y/o viabilidad celular se utilizó el método del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (*MTT*, del inglés, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (Denizot y Lang, 1986). Este método se basa en la reducción del MTT por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, dando lugar a formazán, compuesto insoluble de color morado, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de formazán producido es proporcional al número de células viables. Para llevar a cabo dicho ensayo, se sembraron 20.000 células por pocillo de cada tipo celular en placas de 96 pocillos con base transparente (BD Biosciences, San Jose, CA). Para el experimento de los modelos celulares, después de 6 horas de incubación (para permitir la adherencia a la placa), el medio de cultivo se reemplazó por el medio correspondiente que contenía un 1% de FBS sin exosomas. Transcurridas las 24 y 48 horas, se añadió la solución del *MTT Cell Proliferation Assay Kit* (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) y, después de 3 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el medio, se disolvieron los cristales de formazán y se obtuvo la medida de absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

Para el ensayo con exosomas, se sembraron 20.000 células de T47D vector vacío en medio 1% de FBS sin exosomas, y se incubaron con 100 µL de exosomas derivados de células (i) T47D control, (ii) T47D-CXCR4, (iii) HCC38 y (iv) MDA-MB-231 durante 24 y 48 horas. Al

finalizar los tiempos de tratamiento, se añadió la solución de MTT y se reveló como se indica anteriormente.

10.2. MIGRACIÓN CELULAR

Para la realización de este ensayo, se sembraron 100.000 células de las distintas líneas tumorales de mama en placas de 24 pocillos con base transparente. Se cultivaron mediante la tecnología *transwell* con insertos de membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 8,0 μm (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY).

Los experimentos se realizaron en medio de cultivo con un 1% de FBS sin exosomas. Transcurridas 24 horas, las células epiteliales que alcanzaron la cara interna del filtro del inserto o el compartimento inferior, se recogieron mediante tripsinización y se resuspendieron en 1 mL de PBS. A continuación, dicho volumen se trasladó a una placa de 24 pocillos (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY) en la cual se procedió a cuantificar las células viables usando el kit comercial *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, WI), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ensayo *CellTiter-Glo®* se basa en la emisión de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente en los lisados celulares. La cantidad de ATP a su vez sería un indicador del número de células metabólicamente activas. La intensidad de la señal luminiscente emitida por el cultivo celular se midió con el lector de placas Infinite® 200 PRO (Tecan Trading AG, Switzerland) mediante la interpolación con una curva estándar.

Para el ensayo con exosomas, se sembraron 100.000 células de T47D vector vacío en medio 1% de FBS sin exosomas, y se incubaron con 100 μL de exosomas procedentes de células (i) T47D control, (ii) T47D-CXCR4, (iii) HCC38 y (iv) MDA-MB-231 durante 24 horas. Al finalizar el tiempo de tratamiento, se procedió tal y como se describe anteriormente, cuantificando las células viables mediante el kit comercial *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, WI) y cuantificando la intensidad de la señal luminiscente emitida con el lector de placas Infinite® 200 PRO (Tecan Trading AG, Switzerland). Los resultados fueron normalizados con respecto a la emisión obtenida en los pocillos correspondientes a la incubación con exosomas derivados de las células control.

10.3. INVASIÓN CELULAR

Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron 100.000 células de las distintas líneas tumorales de mama en placas de 24 pocillos con base transparente. Se cultivaron mediante la tecnología *transwell* con insertos de membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 8,0 μm (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY), los cuales se cubrieron previamente con una matriz de *matrigel* (10,6 mg/mL, BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, San Jose, CA). Dicha matriz se formó a 37°C y 5% de CO₂ durante una hora. Los experimentos se realizaron en medio de cultivo con un 1% de FBS sin exosomas durante 72 horas. Después de este tiempo de incubación, el protocolo se desarrolló siguiendo la pauta indicada para los ensayos de migración (**véase apartado 10.2.**).

Para el experimento con exosomas, las células T47D vector vacío en medio 1% de FBS sin exosomas se incubaron con 100 μL de exosomas procedentes de células (i) T47D control, (ii) T47D-CXCR4, (iii) HCC38 y (iv) MDA-MB-231 durante 72 horas, con una adición de los mismos cada 24 horas. Seguidamente, se procedió tal y como se ha descrito previamente (**véase apartado 10.2.**).

11. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

11.1. XENOTRASPLANTES TUMORALES

El procedimiento que a continuación se detalla fue revisado por el Comité de Ética para el Bienestar Animal (CEBA) del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda (IDIPHIM), cumpliendo con los requisitos sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013, Ley 6/2013).

El acondicionamiento de los animales se estableció por la Unidad del Animalario del Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda. Brevemente, las condiciones de alojamiento fueron: 15 a 20 renovaciones de aire por hora, temperatura de 20-24°C, humedad del 55% +/- 10% períodos de 12 horas de luz y oscuridad y aislamiento de ruidos que pudiesen afectar el

bienestar de los animales. Se distribuyeron 5 ratones por caja de 530 cm². Se alimentaron con pienso (Harlan Laboratories, Barcelona, Spain) irradiado y agua autoclavada *ad libitum*.

Para el estudio de la implicación de *CXCR4* en el desarrollo y/o progresión del cáncer de mama en modelos *in vivo*, se desarrollaron xenotrasplantes ortotópicos de los modelos celulares modificados en ratones hembra Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} (Harlan Laboratories, Barcelona, Spain) de cinco semanas de edad.

En primer lugar, se llevó a cabo un experimento ortotópico preliminar para determinar si las líneas parentales (T47D y MDA-MB-231) y las líneas modificadas con *CXCR4* (T47D-CXCR4 y MDA-MB-231-CXCR4) eran capaces de formar tumores al implantarlas en las mamas de los ratones inmunodeprimidos. Una vez realizado este estudio, el objetivo fue determinar si los exosomas liberados por las líneas control e infectadas modificaban la capacidad tumorigénica y metastásica de las líneas celulares que forman dichos tumores.

Para el diseño experimental se utilizaron el menor número de ratones posible, pero necesarios para obtener resultados estadísticamente significativos. Finalmente, se utilizaron 20 ratones por experimento independiente, 10 ratones por línea celular.

Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2,5%. Se llevó a cabo una inyección subdérmica por glándula mamaria (una inyección por animal: mama izquierda), en el ducto que conecta los pezones de las mamas axilares 2ª y 3ª. Se inocularon 1x10⁶ de células (un millón para T47D vector vacío, T47D-CXCR4, MDA-MB-231 vector vacío y MDA-MB-231-CXCR4) en 50 µL de una solución formada por el medio específico de la línea celular (sin suero) resuspendidas en 20% de *matrigel* (BD Biosciences, San Jose, CA) respecto al volumen total. Los tumores se midieron tres veces por semana con un calibre y el volumen tumoral se calculó usando la fórmula $0,5ab^2$ (a y b, diámetros largo y corto, respectivamente). Se trató de terminar el estudio tan pronto como fuese posible para minimizar los efectos adversos del procedimiento.

En segundo lugar, para los experimentos con tratamiento de exosomas, se llevó a cabo una inyección subcutánea en la que se inocularon, por un lado, 1x10⁶ de células de T47D vector vacío, y/o por otro, un millón de MDA-MB-231^{FLuc} en 50 µL de una solución formada por el medio específico de cada línea celular (sin suero) resuspendidas en 20% de *matrigel* (BD Biosciences, San Jose, CA) respecto al volumen total. Para el modelo de las células tumorales T47D vector vacío, al ser unas células epiteliales que no desarrollan tumor, los ratones se

pretrataron previo a la inoculación celular durante tres semanas con exosomas derivados de las células T47D control y de las T47D-CXCR4. Un día después de la inoculación celular, 200 µL de exosomas (15 µg de proteína total) derivados de las células con sobreexpresión de *CXCR4* o exosomas control resuspendidos en PBS se inyectaron por la vena de la cola tres veces por semana durante cinco semanas.

Para el modelo de las células tumorales MDA-MB-231^{FLuc}, al siguiente día de la inoculación celular, 200 µL de exosomas derivados de las células MDA-MB-231 con sobreexpresión de *CXCR4* o exosomas de las células MDA-MB-231 control resuspendidos en PBS se inyectaron por la vena de la cola tres veces por semana durante cinco semanas.

El sacrificio se realizó anestesiando a los ratones por vía inhalatoria con isoflurano y, a continuación, se llevó a cabo una punción intracardiaca y dislocación cervical al término de los experimentos, o cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 1500 mm³, o apareció cualquiera de los síntomas descritos en la *OECD (Guidance Document for the Recognition, assessment, and use of clinical signs as Humane Endpoint for Experimental Animal Used in Safety Evaluation)*, como fue el inicio de ulceración de la zona tumoral.

Una vez sacrificados los animales, se extirparon los tumores, los ganglios linfáticos axilares e inguinales, los pulmones, el bazo y el cerebro, los cuales se diseccionaron y procesaron para los análisis correspondientes.

En el estudio piloto, la posible presencia de células metastásicas en los ganglios linfáticos se detectó por fluorescencia (*GFP*) mediante microscopía confocal TCS SP5 (Leica Microsystems, Barcelona, Spain). Las imágenes se analizaron con el *software Leica Application Suite 2.02 (LAS)*. La mitad de los tumores y los ganglios linfáticos se fijaron en una solución de PFA, y la otra mitad del tumor se congeló y se conservó a -80°C.

11.2. MODELO ORTOTÓPICO CON TRATAMIENTO DE EXOSOMAS. BIOLUMINISCENCIA *IN VIVO* Y *EX VIVO*

La bioluminiscencia (BLI) es una técnica de marcaje del tejido tumoral en los modelos animales con gran potencial, de elevada sensibilidad y de fácil detección e interpretación. El

gen de la *luciferasa* puede ser incorporado de manera estable en células tumorales y en la presencia de su sustrato (D-luciferina), da lugar a una reacción química que producirá la emisión de luz. Así permite la monitorización y cuantificación de actividades celulares y genéticas dentro de un organismo vivo a tiempo real. La imagen óptica es no invasiva, y en consecuencia no requiere del sacrificio de los animales, permitiendo la obtención de múltiples imágenes longitudinales de mismo animal.

El sustrato D-Luciferina (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) se inyectó intraperitonealmente (i.p.) en dosis 125 mg/Kg dos minutos antes de que fuese sedado. Posteriormente, los animales se colocaron en la cámara de captación de imágenes para la adquisición de las mismas.

El primer control del modelo ortotópico se realizó en la primera semana tras la implantación de las células infectadas. En este primer control se determinó la cinética de la D-luciferina, tomando imágenes cada 2 minutos durante 20 minutos. De este modo definimos el minuto más adecuado tras la inyección de D-luciferina para captar las imágenes y comparar los resultados a lo largo del seguimiento. Posteriormente, la imagen se tomó semanalmente durante todo el experimento para evaluar el crecimiento del tumor y la diseminación metastásica. Para cuantificar las señales, se determinaron las Regiones de Interés (ROIs) para obtener los fotones por segundo (f/s) de dichas regiones. De esta forma se definió la curva de emisión de bioluminiscencia a lo largo del tiempo, que nos permitió ver la evolución de la intensidad de la señal a lo largo de los días tras la inoculación de las células tumorales, tanto del tumor primario como de las metástasis.

El día de finalización del experimento, previamente a la realización de la necropsia, a los animales se les inyectó el sustrato D-luciferina. Durante la necropsia se realizó una evaluación macroscópica. Se procedió a la disección de los órganos: bazo, ganglios linfáticos inguinales, ganglios linfáticos axilares, pulmones y cerebro. Cada órgano se sumergió en una solución de D-luciferina 300 µg/mL PBS hasta la realización de la bioluminiscencia *ex vivo*. Los órganos se introdujeron en la plataforma de adquisición de imágenes (ORCA-2BT Digital CCD camera, Hamamatsu Photonics, France) y se determinó la cantidad de señal bioluminiscente en cada uno de ellos mediante el *software Hokawo* (Hamamatsu Photonics, France). Inmediatamente después, los tejidos se limpiaron de la solución de D-luciferina y se procesaron en formaldehído al 4% para poder proceder a la fijación de los tejidos para su examen histológico.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados derivados de los ensayos *in vitro* se representaron como la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Se analizaron mediante comparación de medias empleando el test paramétrico de *t* de Student, valorando previamente la igualdad de varianzas con el test de Levene. Los ensayos *in vivo* se representaron como la media \pm desviación estándar de al menos 8 ratones. Los resultados se analizaron por comparación de medianas aplicándose el test no paramétrico de *U* de Mann-Whitney. A fin de determinar asociaciones entre los grupos de muestras con los niveles de expresión de ARNm, características clínico-patológicas y marcadores inmunohistoquímicos, se utilizó la prueba chi-cuadrado de Pearson.

En el estudio de la expresión de la firma de “pluripotencialidad y metástasis” en pacientes de cáncer de mama, se dividió a los mismos en grupos de alta o baja expresión de los niveles relativos de cada uno de los ARNms seleccionados (*NANOG*, *NEUROD1*, *HTR7*, *KISS1R* y *HOXC6*) en función del punto de corte establecido mediante el Índice de Youden (IY). El IY seleccionado para cada uno de los genes se encontró en los siguientes intervalos: i) *NANOG*, 907,28-965,25 (SG) y 1041,99-1045,04 (SLE); ii) *NEUROD1*, 597,11-621,87 (SG y SLE); iii) *HTR7*, 40,08-41,09 (SG y SLE); iv) *KISS1R*, 22,55-23,31 (SG y SLE); v) *HOXC6*, 37,70-38,82 (SG) y 36,64-37,10 (SLE).

Las curvas de supervivencia, la relación entre la probabilidad acumulada de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad así como los predictores analizados, se generaron con el estimador de Kaplan-Meier, y las diferencias significativas entre curvas se compararon con el estadístico log-rank (test de Mantel-Cox). Se realizó un análisis multivariante por regresión de Cox para evaluar la importancia de los factores predictivos de la supervivencia. El riesgo relativo para todos los factores se calculó con intervalos de confianza (IC) del 95%. En todos los análisis estadísticos se consideraron significativos (*p*) los valores inferiores a 0,05 en contrastes de dos colas. Se usó el *software* estadístico SPSS para Windows versión 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) en el análisis de los datos y en las comparaciones estadísticas. Todas las gráficas se completaron usando el *software* GraphPad Prism VI.

RESULTADOS

1. Las células transfectadas con CXCR4 muestran un incremento en la expresión de marcadores asociados con pluripotencia

Para llevar a cabo este estudio, en primer lugar se evaluó la pluripotencialidad de las tres líneas celulares derivadas de tumores de mama humanos seleccionadas para el mismo (T47D, MDA-MB-231 y HCC38), mediante la valoración de la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (en adelante, ALDH) analizada por citometría de flujo. En concordancia con la literatura (Charafe-Jauffret *et al.*, 2009), las proporciones de células pluripotentes obtenidas fueron del 0,4% para la línea celular T47D, del 2,5% para la línea MDA-MB-231 y del 100% de células ALDH positivas para HCC38 (**Figura 4, A y B**).

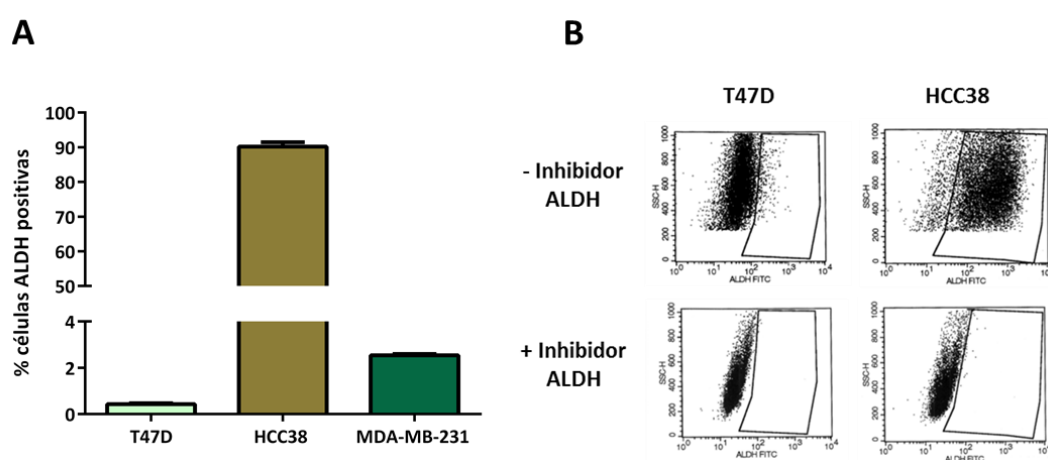


Figura 4. Análisis de la pluripotencialidad de las tres líneas de carcinoma de mama seleccionadas para este trabajo. (A) Cuantificación del porcentaje de células positivas para la actividad enzimática de la ALDH en las líneas celulares T47D (0,4%), HCC38 (100%) y MDA-MB-231 (2,5%) mediante citometría de flujo. **(B)** Representación gráfica de la población celular T47D y HCC38 en ausencia (-) y/o presencia (+) del inhibidor de la enzima ALDH.

Además de mostrar ausencia de características de pluripotencia, la línea celular T47D se ha descrito ampliamente como una línea tumoral que carece de habilidad metastásica e invasiva, y que solamente es capaz de formar tumores en presencia de estrógenos (Holliday y Speirs, 2011). Por estas razones, la línea celular de cáncer de mama T47D se transfectó de forma estable con una construcción del gen *CXCR4*. Como se esperaba, la expresión del mensajero de *CXCR4* se incrementó significativamente (200 veces) en las células T47D-CXCR4 con respecto a las células transfectadas de forma estable con el vector vacío (**Figura 5A**). Las otras dos líneas tumorales de mama utilizadas como controles de pluripotencia y metástasis fueron las HCC38 y las MDA-MB-231, respectivamente. A continuación, se analizó el efecto de la sobreexpresión de *CXCR4* sobre los marcadores asociados con pluripotencia (Darini *et al.*,

2012). El análisis cuantitativo mostró mayores niveles de expresión de los genes *SOX2*, *KLF4*, *NANOG* y *cMYC* en las células que sobreexpresaban *CXCR4* con respecto a las células control.

Por el contrario, los niveles de ARNm para *OCT3* (también conocido como *POU5F1*) y *LIN28* disminuyeron en las células T47D-CXCR4 al compararlas con las células T47D vector vacío. En el caso de las líneas celulares HCC38 y MDA-MB-231, los niveles de expresión de ARNm de los marcadores asociados con pluripotencia, excepto para el gen *LIN28*, permanecieron elevados con respecto al control (Figura 5B).

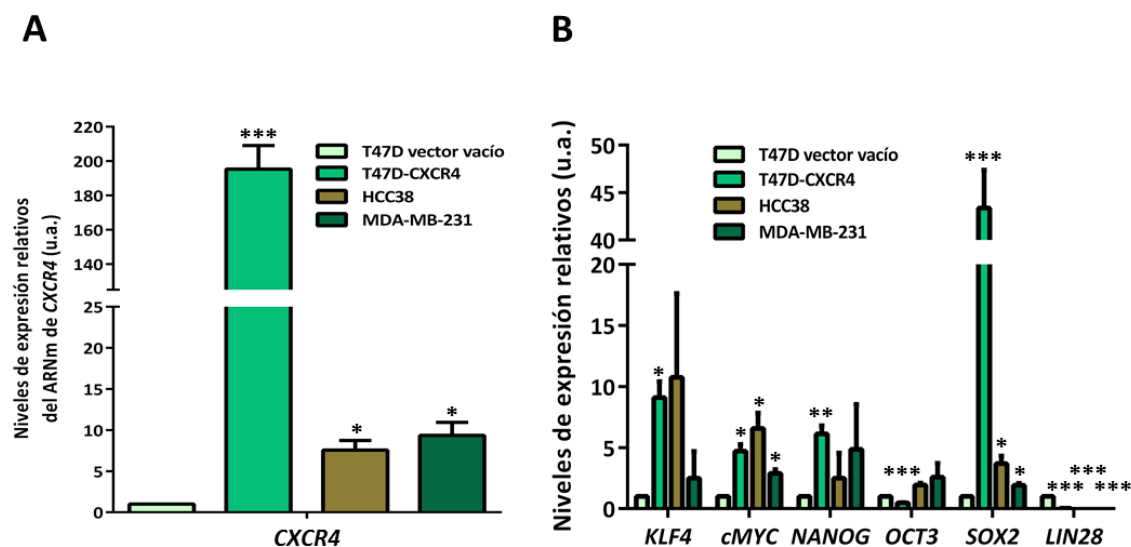


Figura 5. Las células transfectadas con CXCR4 muestran un incremento en la expresión de marcadores asociados con metástasis y pluripotencia. (A) Niveles de expresión relativa del ARNm de CXCR4 (unidades arbitrarias) en las líneas T47D vector vacío, T47D-CXCR4, HCC38 y MDA-MB-231. **(B)** Niveles de expresión relativa del ARNm (unidades arbitrarias) de genes candidatos asociados con pluripotencialidad en el conjunto de líneas celulares de mama tumorales. Se representan las medias y las desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes. Nivel de significación con respecto al control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Varios estudios sugieren una asociación entre la transición epitelio-mesénquima (en adelante, TEM) y la adquisición de características de pluripotencia (Mani *et al.*, 2008; Singh y Settleman, 2010). En las tres líneas en estudio se cuantificaron los niveles de ARNm de dos marcadores asociados con la TEM, esto es, *SNAI1* y *CDH1* (*E-cadherina*) (Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2013; Herrera *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2015). Tanto en las T47D-CXCR4 como en las HCC38 se detectó un aumento en la expresión del mensajero de *SNAI1*, y se observó también una disminución estadísticamente significativa de los niveles de *CDH1* en las T47D-CXCR4, en las HCC38 y en las MDA-MB-231 respecto a las células T47D vector vacío (Figura 6A).

En cáncer de mama, se han descrito diferentes marcadores de superficie, tales como CD44^{high} y CD49f^{high} (ITGA6), que distinguen las distintas subpoblaciones de células tumorales

con características de célula madre (Hwang-Verslues *et al.*, 2009; Manello, 2013). Por citometría de flujo, se cuantificaron los dos antígenos de superficie CD44 y CD49f en las células T47D-CXCR4, HCC38 y MDA-MB-231 con respecto a las células T47D vector vacío, mostrando una mayor expresión de ambos marcadores relacionados con un fenotipo *stem* (mayor capacidad de pluripotencialidad) (Figura 6B).

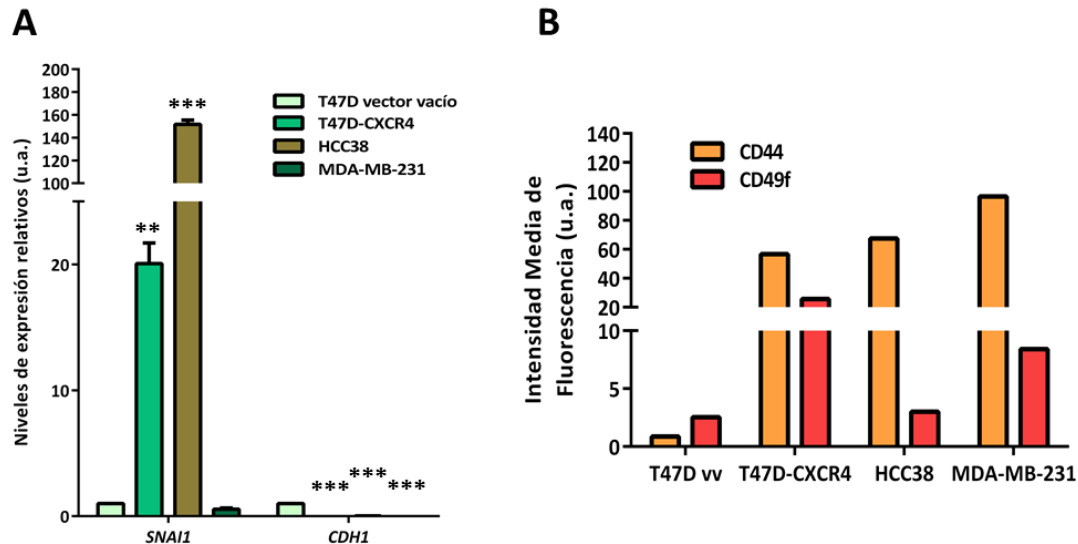


Figura 6. Las células transfectadas con CXCR4 muestran un incremento en la expresión de marcadores asociados con TEM y pluripotencia. (A) Niveles de expresión relativa del ARNm (unidades arbitrarias) de genes relacionados con TEM en las líneas T47D vector vacío, T47D-CXCR4, HCC38 y MDA-MB-231. Se representan las medias y las desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes. Nivel de significación con respecto al control: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. **(B)** Intensidad Media de Fluorescencia (unidades arbitrarias) de los marcadores de superficie CD44 y CD49f relacionados con un fenotipo *stem* en las células T47D vector vacío, T47D-CXCR4, HCC38 y MDA-MB-231.

Estos resultados permiten concluir que la transfección con CXCR4 de las células tumorales de mama T47D carentes de capacidad de pluripotencia, muestran un incremento de los marcadores asociados con dicha habilidad.

2. La expresión de CXCR4 induce un efecto en la proliferación, en la migración y en la invasión de las células de cáncer de mama *in vitro*

Todos los experimentos *in vitro* descritos en este apartado, se realizaron a diferentes tiempos: (i) proliferación (24 y 48 horas), (ii) migración (24 horas) e (iii) invasión (24 y 72 horas). En la descripción de cada uno de los resultados se especifica el tiempo seleccionado.

Para evaluar si CXCR4 promueve un efecto proliferativo en las células de cáncer de mama, se realizó el ensayo de proliferación celular MTT que reveló que las células T47D-CXCR4 presentaban una mayor tasa proliferativa respecto a las T47D vector vacío. De la misma manera, la línea celular MDA-MB-231 mostraba un incremento significativo en su tasa de proliferación en comparación con las células control. Sin embargo, en las HCC38 no se observó ningún cambio en su tasa de proliferación con respecto a las T47D vector vacío después de 48 horas (**Figura 7A**).

Además del efecto de CXCR4 en la capacidad proliferativa, se realizó el ensayo de trans migración en *transwell* o insertos para estudiar la migración celular de las distintas líneas tumorales de mama. Al cabo de 24 horas, las células T47D-CXCR4, las MDA-MB-231 y las HCC38 mostraron una mayor tasa de migración a través de los insertos en comparación con las células T47D vector vacío (**Figura 7B**).

En último lugar, para evaluar si también CXCR4 producía un efecto en la capacidad de las células para invadir, se realizó el ensayo de invasión celular mediante el sistema en *transwell* incorporando una capa de matrigel en el inserto superior. Después de 72 horas, las células T47D-CXCR4 y las MDA-MB-231 mostraron una mayor capacidad invasiva de 5 y 3 veces en relación a la invasión de las células control. Sin embargo, las HCC38 presentaron una reducción significativa en la invasión (**Figura 7C**).

Para los tres ensayos *in vitro* se utilizaron como controles de pluripotencia y metástasis las células HCC38 y las células MDA-MB-231, respectivamente.

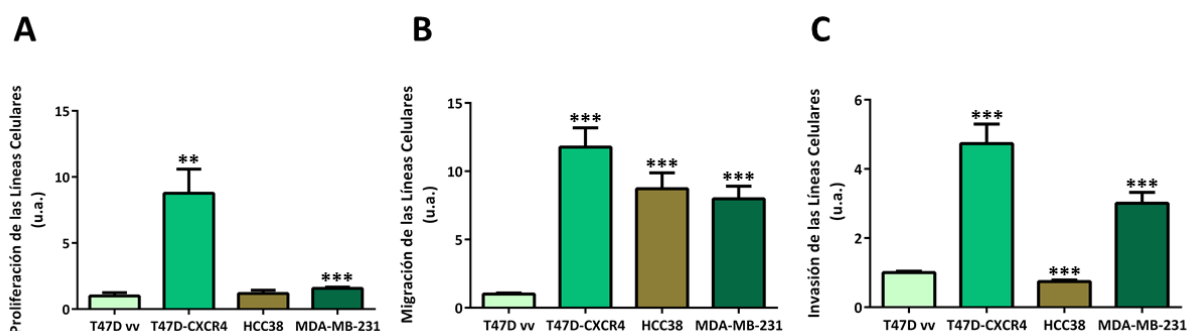


Figura 7. La expresión de CXCR4 modifica la proliferación, la migración y la invasión de las células de cáncer de mama. (A) Tasa de proliferación (unidades arbitrarias) de las líneas celulares T47D vector vacío, T47D-CXCR4, HCC38 y MDA-MB-231 (48 horas). **(B)** Tasa de migración (unidades arbitrarias) de las líneas celulares T47D vector vacío, T47D-CXCR4, HCC38 y MDA-MB-231 (24 horas). **(C)** Tasa de invasión (unidades arbitrarias) de las líneas celulares T47D vector vacío, T47D-CXCR4, HCC38 y MDA-MB-231 (72 horas). El conjunto de líneas celulares se plaquearon a igual densidad y en el tiempo determinado se realizó el ensayo correspondiente, obteniéndose un valor de absorbancia y luminiscencia proporcional al número de células viables en el cultivo. Se representan las medias y las desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes. Nivel de significación con respecto al control: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Estos datos indican que la sobreexpresión de CXCR4 produce *in vitro* un incremento en la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva de las células de cáncer de mama.

3. La expresión de CXCR4 ejerce un efecto sobre la capacidad tumorigénica de las células de carcinoma de mama en modelos animales

Según los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*, se decidió caracterizar *in vivo* las propiedades oncogénicas de CXCR4. Para ello, se inocularon los modelos celulares de sobreexpresión de CXCR4 (1×10^6 células), así como las respectivas células control, en la segunda mama de ratones inmunodeprimidos (Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}) mediante xenotrasplantes ortotópicos. Los *xenografts* frecuentemente se generan mediante la inyección subcutánea de las células tumorales en el flanco del ratón, pero este microambiente puede perturbar el crecimiento y la metástasis potencial de las células implantadas. Una variación de esta metodología es el trasplante ortotópico de las células en el interior de la glándula mamaria del ratón. El entramado de la mama en ratones no posee alvéolos y lóbulos semejantes a la glándula mamaria humana, sino que consta de unas pequeñas evaginaciones al final de los ductos que se desarrollan durante la pubertad. Además, la glándula mamaria de ratón posee menos tejido fibroso conectivo que la mama humana, pero considerablemente más adipocitos. A pesar de dichas diferencias en la arquitectura de las ramificaciones de los ductos entre ambas especies, así como en el estroma, existen evidencias que revelan considerables paralelismos en sus estructuras celulares y lo que es más importante, se favorece la existencia de un microambiente más propicio para las células injertadas (Visvader, 2009). Durante el desarrollo de los experimentos, se evaluó la aparición de los tumores en las mamas de los ratones y se cuantificó periódicamente el volumen de los mismos. Cada día de medición se calculó el volumen medio de los tumores en cada grupo experimental.

Según lo descrito en la literatura, la línea tumoral de cáncer de mama T47D es una línea celular de tipo luminal A positiva para RE, con baja capacidad pluripotente y metastásica, que sólo es capaz de implantar y formar tumores en presencia de estrógeno (Holliday y Speirs, 2011). Sin embargo, se observó que la sobreexpresión de CXCR4 en la línea T47D indujo la formación de tumores en las mamas de los ratones inmunodeprimidos transcurridos 10 días desde su inoculación. Por el contrario, los ratones inoculados con las células T47D control no

presentaron signos de malignidad en las mismas durante todo el desarrollo del experimento. En la **Figura 8A** se representa la curva de crecimiento del tumor generado por las células con sobreexpresión de CXCR4, siendo las diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células T47D control a partir de los 12 días después de la inoculación. Tras finalizar el experimento, se valoraron los ganglios linfáticos (axilares e inguinales) extirpados de los ratones del grupo CXCR4 y de los ratones control mediante imágenes obtenidas a través de microscopía confocal (**Figura 8B**). Se observó la existencia de células tumorales (micrometástasis) en los ganglios linfáticos procedentes de los ratones inoculados con las células T47D que sobreexpresan CXCR4, mientras que en los ratones inoculados con las células control no se observaron dichas células tumorales.

Con el fin de validar el papel de CXCR4 sobre la capacidad tumorigénica en modelos animales, se seleccionó otro modelo celular de cáncer de mama para llevar a cabo un nuevo experimento *in vivo*, el cual ya mostraba *per se* capacidad tumorigénica y metastásica. La línea tumoral MDA-MB-231 es una línea celular hormono-independiente con alta capacidad de pluripotencia y de metástasis (Lacroix y Leclercq, 2004). Se transfectó dicha línea celular con CXCR4 y, posteriormente, se procedió a realizar el experimento en ratones inmunodeprimidos. Como se observa en la **Figura 8C**, la velocidad de crecimiento de los tumores generados por las células MDA-MB-231 que sobreexpresan CXCR4 fue mayor respecto a la de los tumores procedentes de la inoculación con las células control, siendo las diferencias estadísticamente significativas a partir del día 24 desde el inicio del experimento. Una vez finalizado el experimento, se extirpó el tumor y se extrajo el ARN total del mismo. Se evaluaron los niveles relativos de expresión de ARNm de genes implicados en la capacidad de pluripotencialidad.

Los niveles de *CXCR4* y *KLF4* en los tumores del grupo inoculado con las células MDA-MB-231 que sobreexpresan *CXCR4* aumentaron significativamente en comparación al grupo control. Sin embargo, se observó una disminución en los niveles de ARNm de *LIN28* (**Figura 8D**). Además, los ganglios linfáticos procedentes de los ratones inoculados con las células MDA-MB-231 que sobreexpresan *CXCR4* mostraron mayor cantidad de células tumorales frente a los animales inoculados con las células control (véase **Figura 8B**).

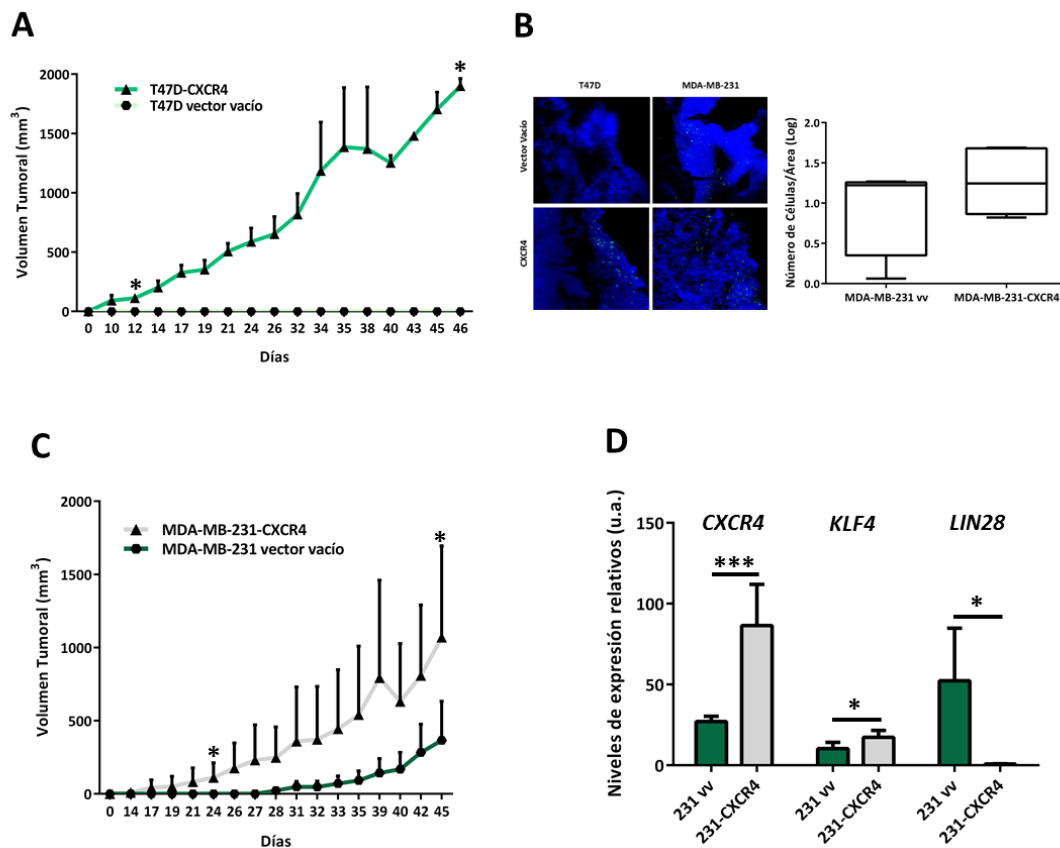


Figura 8. La expresión de *CXCR4* ejerce un efecto sobre la capacidad tumorigénica de las células de cáncer de mama en modelos animales. (A) Análisis y cuantificación del crecimiento tumoral de la línea celular T47D vector vacío *versus* T47D-CXCR4 en un modelo ortotópico. **(B)** Microscopía confocal y representación gráfica de la afectación ganglionar en un modelo ortotópico con la línea celular MDA-MB-231 vector vacío *versus* MDA-MB-231-CXCR4. **(C)** Análisis y cuantificación del crecimiento tumoral de la línea celular MDA-MB-231 vector vacío *versus* MDA-MB-231-CXCR4 en un modelo ortotópico. **(D)** Niveles de expresión relativos del ARNm (unidades arbitrarias) de *CXCR4*, *KLF4*, *LIN28* en la línea celular MDA-MB-231 vector vacío y MDA-MB-231-CXCR4. Nivel de significación con respecto al control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

En conjunto, los resultados obtenidos *in vivo* revelan el potencial oncogénico de la sobreexpresión de *CXCR4* en modelos celulares de cáncer de mama.

4. Aislamiento, identificación, cuantificación y caracterización de los exosomas liberados por los modelos celulares de cáncer de mama que sobreexpresan *CXCR4*

Con los resultados obtenidos previamente, y con el objetivo de estudiar en detalle el posible efecto de los exosomas liberados por los modelos celulares que sobreexpresan *CXCR4* en un contexto tumoral, se procedió al aislamiento, identificación y caracterización de dichas nanovesículas.

Como ya se ha mencionado en la Introducción, los exosomas son vesículas que se generan en el lumen de los endosomas/lisosomas y se liberan al medio extracelular al fusionarse los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Las líneas celulares T47D y MDA-MB-231 transfectadas establemente con CXCR4 y sus correspondientes controles se cultivaron durante 72 horas en sus respectivos medios suplementados con un 10% de suero sin exosomas. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se llevó a cabo el aislamiento de los exosomas a partir del mismo utilizando el método descrito por Théry y colaboradores (Théry *et al.*, 2006). Para confirmar que las vesículas aisladas fuesen exosomas, se examinaron las preparaciones mediante microscopía electrónica de transmisión (**Figura 9A**). Las imágenes revelaron la presencia de unas estructuras semiovoides con un tamaño aproximado de entre 50 y 150 nm, similar a lo descrito por diversos autores (Cocucci *et al.*, 2008; Gross *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2014). Además, se procedió a la detección y conteo de los exosomas utilizando el equipo NanoSight LM10 (del inglés, *nanoparticle tracking analysis*) (**Figura 9B**). No se observaron diferencias en el número de exosomas liberados entre las células que sobreexpresan CXCR4 y sus controles. Asimismo, se caracterizó mediante inmunotransferencia la presencia de proteínas (10-15 µg) que han sido descritas como marcadores de exosomas, CD63 y CD81 (Lötvall *et al.*, 2014), así como la ausencia de Calnexina, un marcador proteico de retículo endoplasmático utilizado como control negativo (Lässer *et al.*, 2011). También se analizaron estas proteínas en el lisado celular, observándose en concordancia la ausencia de CD63 y CD81, y la presencia de Calnexina (**Figura 9C**). Por último, para poder visualizar la internalización de los exosomas en la célula receptora, dichas nanovesículas procedentes de las células T47D que sobreexpresan CXCR4 se marcaron con el colorante verde fluorescente PKH67, que contiene colas de carbono alifáticas que se incorporan a las regiones lipídicas de la membrana celular, añadiéndose a las células T47D control. Tras 6 horas de incubación, se observó la captura de los exosomas mediante microscopía confocal (**Figura 9D**).

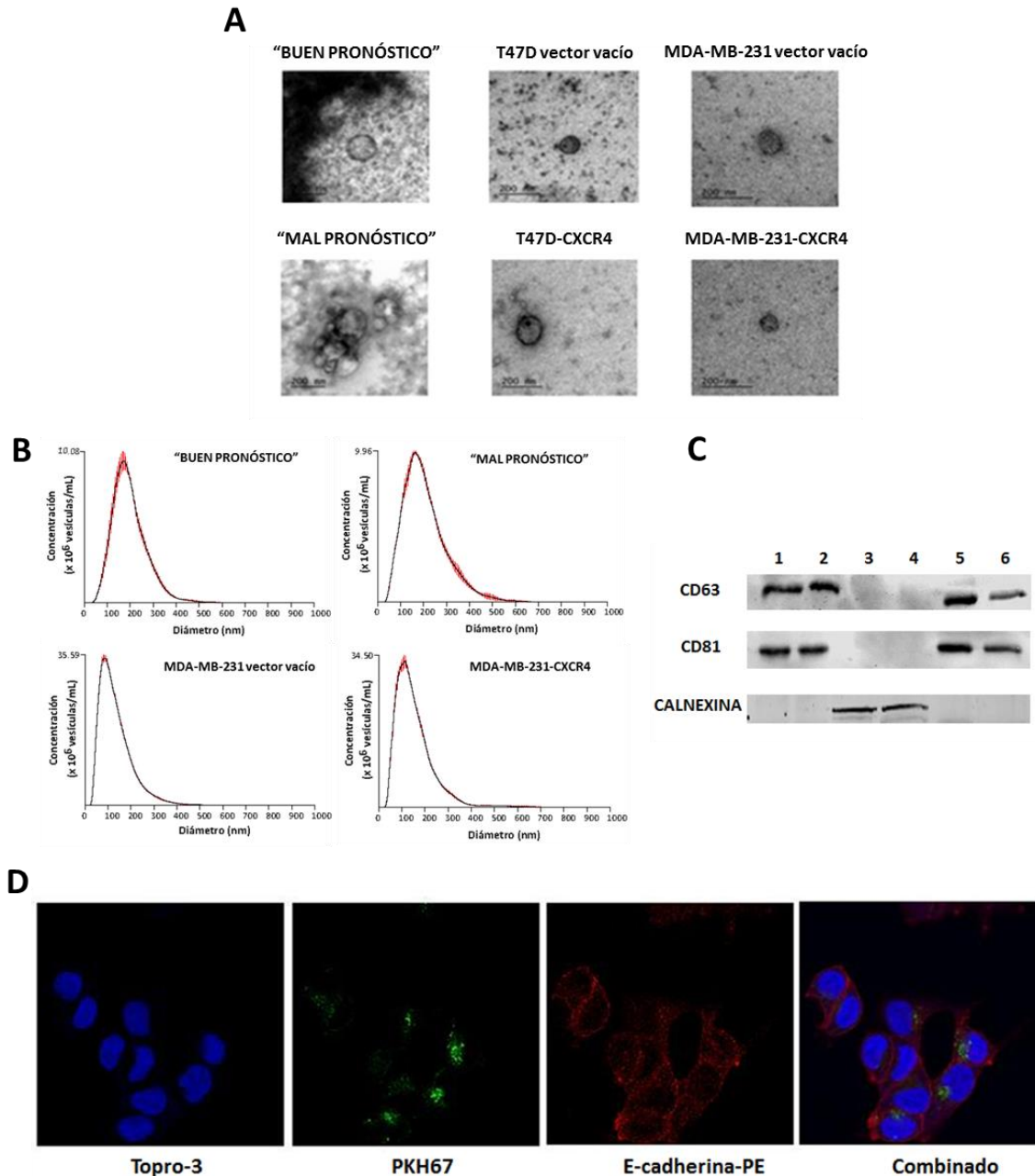


Figura 9. Caracterización de los exosomas liberados por los modelos celulares de cáncer de mama que sobreexpresan CXCR4. (A) Imágenes representativas por microscopía electrónica de transmisión de los exosomas derivados del grupo de pacientes con “Buen Pronóstico”, del grupo de pacientes con “Mal Pronóstico”, de la línea T47D vector vacío, de las T47D-CXCR4, de las MDA-MB-231 vector vacío y de las MDA-MB-231-CXCR4. **(B)** Identificación del tamaño y cuantificación mediante el sistema NanoSight de los exosomas derivados del grupo de pacientes con “Buen Pronóstico”, del grupo de pacientes con “Mal Pronóstico”, de la línea MDA-MB-231 vector vacío y de las MDA-MB-231-CXCR4. **(C)** Inmunotransferencia de CD63, CD81 y Calnexina (control negativo para exosomas) de los exosomas derivados del grupo de pacientes con “Buen Pronóstico” (6), del grupo de pacientes con “Mal Pronóstico” (5), de las T47D vector vacío (2), de las T47D-CXCR4 (1) y de las líneas celulares MDA-MB-231 (3), T47D (4). **(D)** Imágenes representativas por microscopía confocal de la captura y el tráfico de los exosomas (marcados con PKH67) por parte de las células receptoras (núcleo, Topro-3; membrana celular, E-cadherina-PE).

En conjunto, estos resultados muestran el correcto aislamiento, la identificación, la cuantificación y la caracterización de los exosomas liberados al medio de cultivo por los modelos celulares de cáncer de mama en estudio.

5. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan *CXCR4* inducen un efecto paracrino en la expresión de los marcadores relacionados con pluripotencia de las células de cáncer de mama *in vitro*

Para evaluar si los exosomas liberados por las células tumorales de mama que sobreexpresan CXCR4 modifican la capacidad de pluripotencia en las células receptoras de una manera paracrina, se analizaron los niveles de expresión de los distintos marcadores asociados con dicha habilidad en las células T47D control. Para ello, se incubaron las células T47D control con exosomas procedentes de las células T47D que sobreexpresan CXCR4 y de las células MDA-MB-231 control durante 72 horas. El posterior análisis de las células T47D control incubadas con exosomas provenientes de las T47D que sobreexpresan CXCR4, mostró un incremento significativo en la expresión de los niveles relativos de ARNm de *KLF4*, *cMYC*, *OCT3* y *LIN28*. Además, los niveles de *SNAI1*, marcador asociado con el proceso de TEM, también aumentaron significativamente después de la incubación con las nanovesículas.

Por otro lado, se hallaron regulados positivamente los niveles relativos de ARNm de *cMYC*, *NANOG* y *OCT3* en las células T47D control después de la adición de los exosomas originarios de las células MDA-MB-231 control (**Figura 10**).

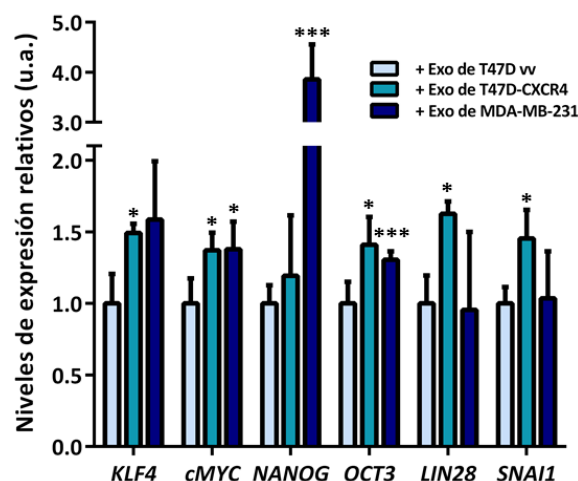


Figura 10. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 modifican la capacidad de pluripotencia en las células receptoras de una manera paracrina. Niveles de expresión relativos del ARNm (unidades arbitrarias) de genes relacionados con pluripotencia al añadir exosomas de las líneas T47D vector vacío, T47D-CXCR4 y MDA-MB-231 a las células T47D control. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes. Nivel de significación con respecto al control: * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

Los resultados obtenidos indicaron que los exosomas derivados de las células tumorales con mayor capacidad de pluripotencialidad modulan diferencialmente los marcadores asociados al fenotipo *stem* en las células adyacentes.

6. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 inducen un efecto paracrina en la proliferación, en la migración y en la invasión de las células de cáncer de mama *in vitro*

Todos los experimentos *in vitro* descritos en este apartado, se realizaron a diferentes tiempos: (i) proliferación (24 y 48 horas), (ii) migración (24 horas) e (iii) invasión (24 y 72 horas). En la descripción de cada uno de los resultados se especifica el tiempo seleccionado.

Para determinar si los exosomas liberados por las células de cáncer de mama que sobreexpresan CXCR4 afectan a la tasa de proliferación celular, se llevó a cabo un ensayo de MTT en el cual se incubaron, previamente y durante 48 horas, las células T47D control con la misma cantidad de exosomas procedentes de los distintos modelos celulares.

Los exosomas derivados de las células T47D que sobreexpresan CXCR4, de las MDA-MB-231 y de las HCC38 produjeron un incremento significativo en la proliferación celular con respecto a las células incubadas en la condición control (**Figura 11A**).

Para estudiar si los exosomas liberados por las células de cáncer de mama que sobreexpresan CXCR4 son capaces de modular la capacidad migratoria de las células, se evaluó el número de células que migran a través del inserto mediante un ensayo luminiscente de viabilidad celular denominado Cell Titer Glo, después de ser incubadas con los exosomas de las células que sobreexpresan CXCR4, de las MDA-MB-231 y de las HCC38 durante 24 horas. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de 1,5 veces en la migración de las células T47D cuando son incubadas con los exosomas procedentes de las que sobreexpresan CXCR4 y, la mitad de veces cuando son incubadas con los exosomas derivados de las MDA-MB-231. Sin embargo, el número de células viables capaces de migrar se vio reducido significativamente cuando la incubación se trató de los exosomas provenientes de las HCC38 en relación a los exosomas control (**Figura 11B**).

Para evaluar si los exosomas derivados de las células tumorales que sobreexpresan CXCR4 son capaces de ejercer un efecto funcional sobre la invasión, se evaluó el número de células, incubadas previamente con los exosomas, que invaden a través del inserto cubierto con matrigel, mediante el ensayo de luminiscencia Cell Titer Glo. Después de 72 horas, las células control incubadas con exosomas procedentes de las T47D que sobreexpresan CXCR4 mostraban mayor capacidad invasiva respecto a las células incubadas en la condición control. Sin embargo, se observó una menor capacidad invasiva de las células T47D incubadas con los exosomas de las HCC38 y con los exosomas de las MDA-MB-231 frente a las células incubadas con los exosomas derivados del control (**Figura 11C**).

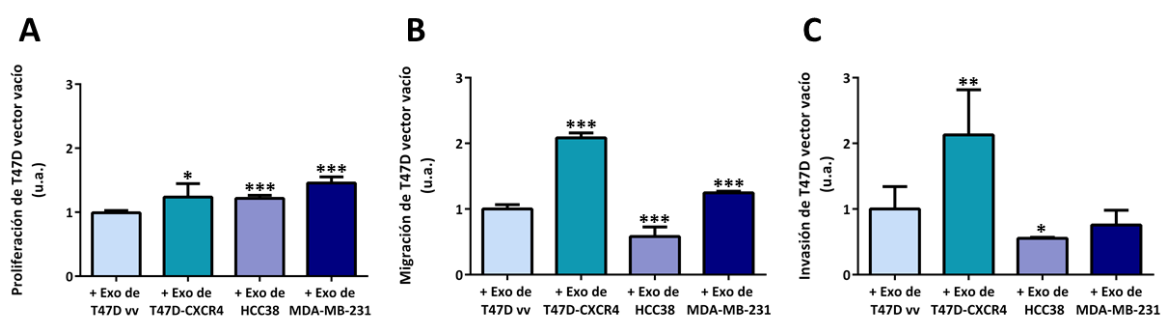


Figura 11. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 modifican la proliferación, la migración y la invasión de las células de cáncer de mama. (A) Tasa de proliferación (unidades arbitrarias) de la línea celular T47D control al añadir los exosomas de las células T47D vector vacío, T47D-CXCR4, HCC38 y MDA-MB-231 (48 horas). **(B)** Tasa de migración (unidades arbitrarias) de la línea celular T47D control al añadir exosomas de las líneas celulares T47D vector vacío, T47D-CXCR4, HCC38 y MDA-MB-231 (24 horas). **(C)** Tasa de invasión (unidades arbitrarias) de la línea celular T47D control al añadir exosomas de las líneas celulares T47D vector vacío, T47D-CXCR4, HCC38 y MDA-MB-231 (72 horas). El conjunto de líneas celulares se plaquearon a igual densidad y se incubaron con los correspondientes exosomas. En el tiempo determinado se realizó el ensayo correspondiente, obteniéndose un valor de absorbancia y luminiscencia proporcional al número de células viables en el cultivo. Se representan las medias y desviaciones estándar de al menos cuatro experimentos independientes. Nivel de significación con respecto al control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Los resultados obtenidos indicaron que los exosomas derivados de las células tumorales con mayor capacidad de pluripotencialidad modulan diferencialmente la proliferación, la migración y la invasión de las células adyacentes.

7. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 incrementan el potencial oncogénico de las células tumorales en ratones inmunodeprimidos

Con el objeto de evaluar si los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 ejercen un efecto sobre la capacidad oncogénica de las células tumorales de cáncer de mama *in vivo*, se realizaron dos estudios experimentales en ratones inmunodeprimidos (Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu). Los dos estudios *in vivo* consistieron en la utilización de la línea celular tumoral de mama MDA-MB-231^{FLuc} (infectada establemente con el gen reportero de la luciferasa) representando un modelo tumorigénico y metastásico, y el uso de la línea celular T47D (GFP/RFP) como modelo no tumorigénico y no metastásico.

En primer lugar, una cantidad de 15 µg de proteína total de exosomas liberados por las células MDA-MB-231 transfectadas con CXCR4 o la misma cantidad de exosomas procedentes de las células MDA-MB-231 control, se inyectaron de forma intravenosa por la cola tres veces por semana, un día después de la inoculación ortotópica de las MDA-MB-231^{FLuc} en la segunda glándula mamaria. Cuando el tumor alcanzó un volumen de 1500 mm³, se extirparon el tumor primario, los ganglios axilares e inguinales, el cerebro, el hígado y el bazo para su posterior análisis. Durante las cinco semanas de tratamiento, se observó un mayor crecimiento tumoral en los ratones tratados con exosomas procedentes de las células MDA-MB-231 que sobreexpresan CXCR4 respecto a los ratones tratados con los exosomas control (**Figura 12A**).

Asimismo, la valoración de la expresión de Ki67 como indicador de proliferación de las células tumorales, reveló un mayor número de células positivas respecto al grupo tratado con los exosomas derivados del control (**Figura 12B**). De la misma manera, los tumores primarios de los ratones tratados con exosomas aislados de las MDA-MB-231 que sobreexpresan CXCR4 presentaron un aumento significativo en los niveles de expresión de genes implicados en pluripotencialidad (*CXCR4* y *NANOG*) y TEM (*SNAI1*) frente al grupo control (**Figura 12C**).

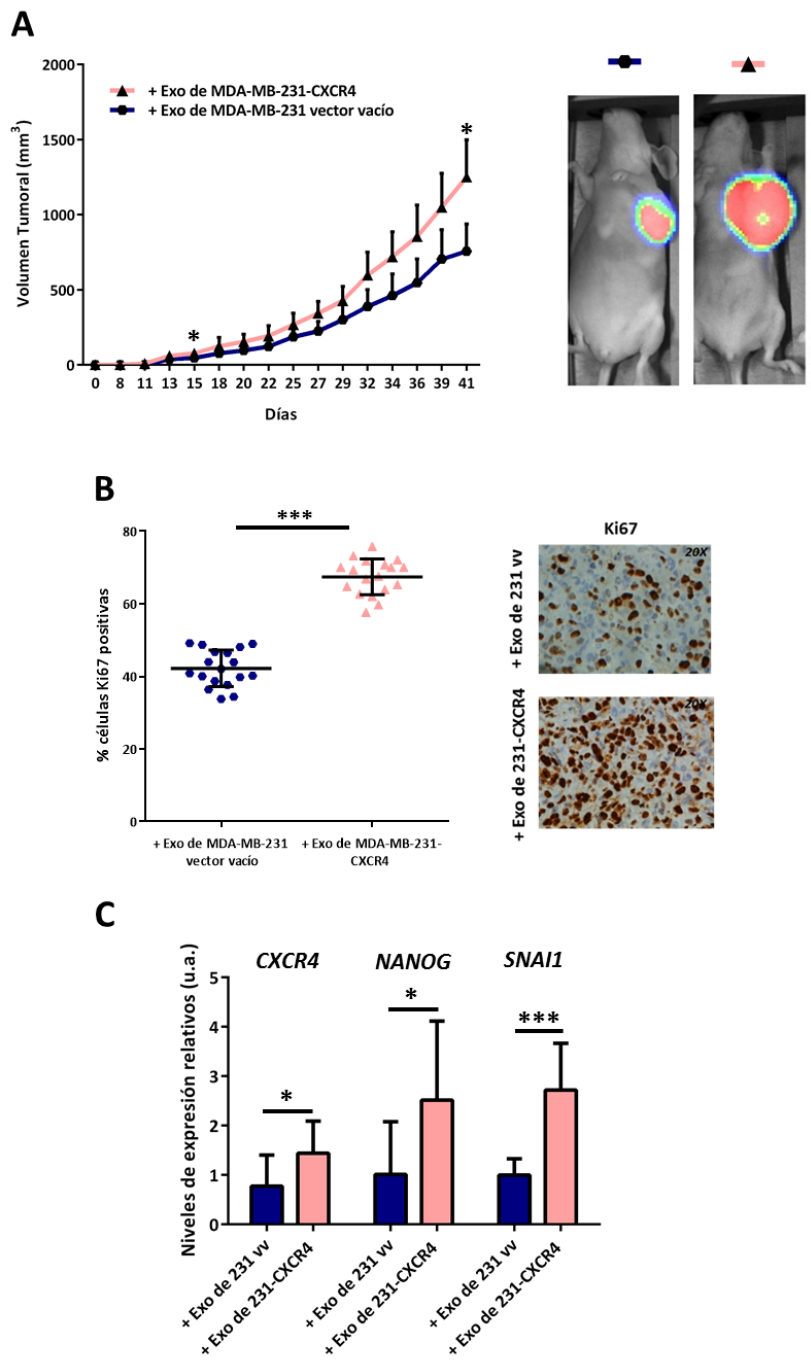


Figura 12. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 incrementan el potencial oncogénico de las células tumorales en modelos animales. (A) Análisis y cuantificación del crecimiento tumoral de la línea celular MDA-MB-231^{FLuc} al inocular exosomas derivados de la línea celular MDA-MB-231 vector vacío (en un grupo de ratones N=10) y exosomas de las MDA-MB-231-CXCR4 (en otro grupo de ratones N=10) en modelos ortotópicos. Imágenes representativas mediante luminiscencia *in vivo* de los tumores primarios correspondientes a dichos ratones. **(B)** Representación gráfica del porcentaje de células Ki67 positivas del tumor primario en los modelos ortotópicos descritos anteriormente. **(C)** Niveles de expresión relativos del ARNm (unidades arbitrarias) de *CXCR4*, *NANOG*, *SNAIL1* de los tumores primarios de los ratones tratados con exosomas derivados de las MDA-MB-231 vector vacío y de las MDA-MB-231-CXCR4. Nivel de significación con respecto al control: * $p<0,05$; *** $p<0,005$.

Por otra parte, mediante luminiscencia *ex vivo*, se evaluó la formación de metástasis en los ganglios linfáticos, en los pulmones y en el cerebro, detectándose un mayor número de focos metastásicos en los ratones tratados con los exosomas procedentes de las células MDA-MB-231 que sobreexpresan CXCR4 (**Figura 13, A y B**).

En concordancia con todos los resultados obtenidos previamente, el estudio inmunohistoquímico reveló la formación de masas tumorales en los ganglios linfáticos y en los pulmones de los ratones tratados con exosomas derivados de las MDA-MB-231-CXCR4 (**Figura 13C**).

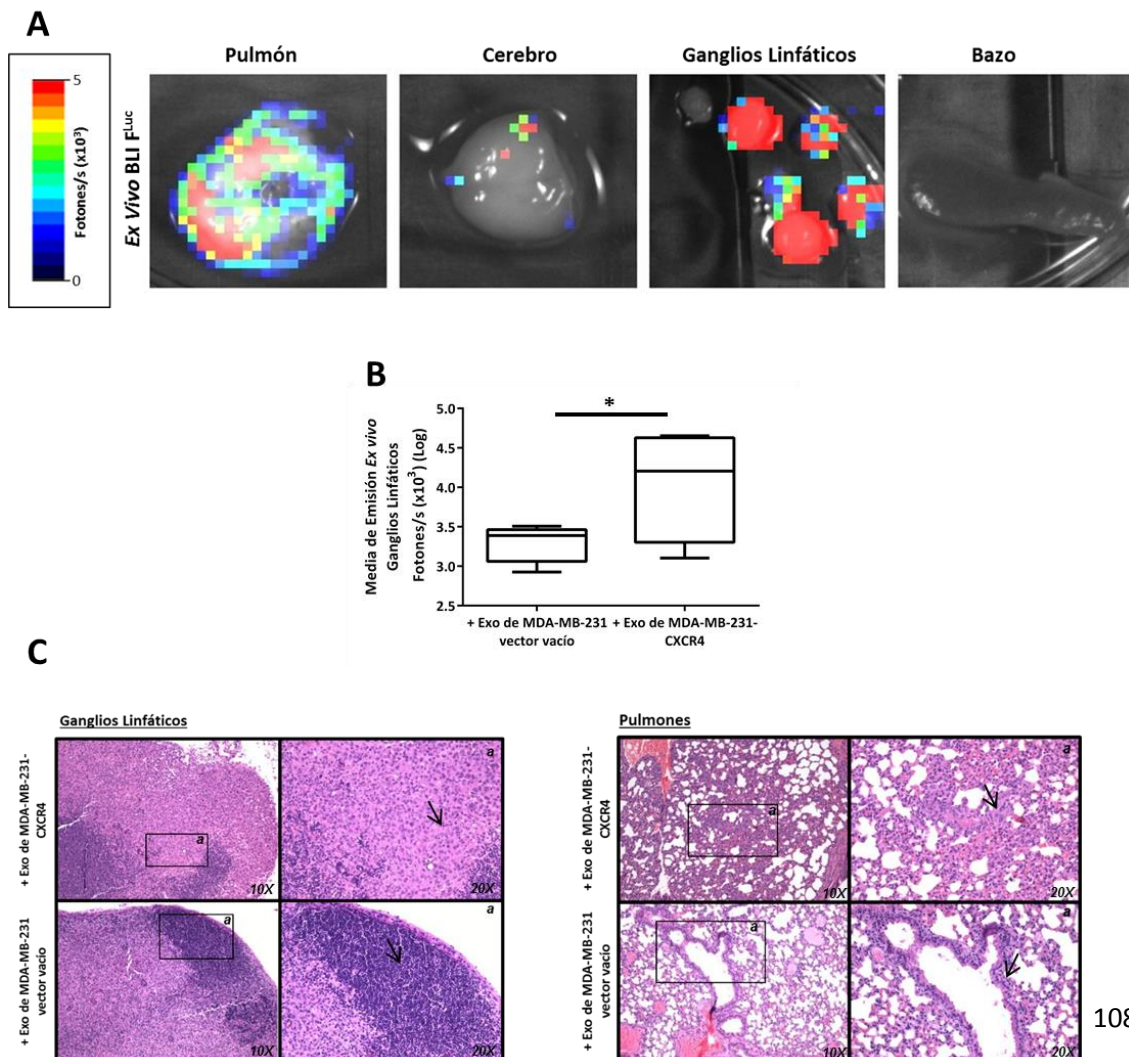


Figura 13. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 incrementan el potencial oncogénico de las células tumorales en modelos animales. (A) Imágenes representativas mediante luminiscencia *ex vivo* de los pulmones, del cerebro, de los ganglios linfáticos de un ratón correspondiente al modelo ortotópico al que se han inoculado exosomas de la línea celular MDA-MB-231-CXCR4. En el bazo no se detectó luminiscencia. **(B)** Representación gráfica de la media de emisión de fluorescencia de los ganglios linfáticos (10s) de los modelos ortotópicos anteriores. **(C)** Inmunohistoquímicas representativas mediante la tinción hematoxilina-eosina de los ganglios linfáticos y de los pulmones correspondientes a los xenotrasplantes tumorales después del tratamiento. Nivel de significación con respecto al control: * $p < 0,05$.

Según lo observado en un resultado anterior, como los ratones inoculados con las células T47D control no desarrollaron tumores primarios, el segundo estudio experimental realizado consistió en pre-tratar a los ratones con una cantidad de exosomas (15 µg de proteína total) procedentes de las T47D-CXCR4 y de las T47D control tres veces por semana durante tres semanas, antes de inocular ortotópicamente las células T47D control; posteriormente, se les inyectaron exosomas por la vena de la cola cada día durante tres semanas más de experimento. Se pudo observar que en los ratones en los que se administraron exosomas derivados de las células T47D-CXCR4 no se apreció tumor primario, aunque sí se detectaron metástasis en los ganglios linfáticos mediante la técnica de microscopía confocal. Sin embargo, los ratones tratados con exosomas provenientes de las células T47D control no presentaron metástasis (**Figura 14**).

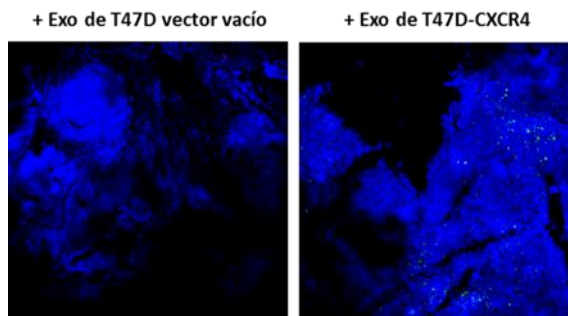


Figura 14. Imágenes representativas mediante microscopía confocal de los ganglios linfáticos de los modelos ortotópicos en los que se ha utilizado la línea celular T47D control, y que han sido tratados con exosomas derivados de las células T47D vector vacío y de las T47D-CXCR4.

En conjunto, estos resultados indican que la carga de los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 ejerce un efecto en el crecimiento tumoral y el potencial metastásico en modelos *in vivo* de cáncer de mama.

8. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan CXCR4 están enriquecidos en ARNms relacionados con pluripotencialidad y metástasis

Es científicamente admitido que los exosomas desempeñan una función muy importante en la comunicación intercelular, por lo que para poder identificar los posibles ARNm vehiculizados en los exosomas que son liberados por las células que sobreexpresan CXCR4, se llevaron a cabo dos *RT²-ProfilerTM PCR Arrays*. El primer PCR Array se seleccionó por su contenido en genes que participan en el proceso metastásico, y el segundo se eligió por presentar un amplio abanico de genes implicados en el desarrollo y diferenciación de las células madre. Los resultados obtenidos fueron analizados y comparados entre los exosomas derivados de las células T47D que sobreexpresan CXCR4, los procedentes de las células T47D control y de las células HCC38 (100% ALDH positivo). En la **Tabla VIII** se muestran los diez genes implicados en metástasis y pluripotencia que presentaron unos mayores niveles de expresión en las células T47D que sobreexpresan CXCR4 y en las células HCC38 con respecto a las células T47D control. En las nanovesículas aisladas a partir de estos dos tipos celulares se encontraron un alto enriquecimiento en dichos ARNs (véase **Figura 15** en el **Apartado 9**). Por lo cual, la sobreexpresión de CXCR4 tiene una implicación en los cambios que experimentan los niveles de ARNs que se encuentran en los exosomas, y este fenómeno se relaciona con los procesos biológicos que desempeñan las células tumorales con alto potencial pluripotente.

T47D-CXCR4		HCC38		Peor Pronóstico	
Pluripotencia	Metástasis	Pluripotencia	Metástasis	Pluripotencia	Metástasis
LMX1B	FXYD5	TLX3	MTA1	HOXC6	KISS1R
PCNA	MTA1	SOX2	MYCL1	NANOG	TSHR
HOXC6	TSHR	SIX2	MMP2	NEUROD1	PTEN
HOXC5	MYCL1	LMX1B	MCAM	HTR7	MMP10
HOXC12	NF2	PCNA	NF2	HOXC4	MGAT5
HOXD1	FLT4	HOXC6	CXCL12	RUNX1	NME4
POU5F1	MCAM	IRX4	FXYD5	STAT3	MDM2
SOX2	PLAUR	HOXD1	PLAUR	RB1	SET
TLX3	KISS1R	HOXC5	TSHR	DLX2	-
SIX2	COL4A2	STAT1	KISS1R	HOXD4	-

Tabla VIII. Los exosomas liberados por las células que sobreexpresan *CXCR4* están enriquecidos en ARNs relacionados con pluripotencia y metástasis. Los genes más representativos (mayores niveles de expresión) relacionados con pluripotencialidad y metástasis en los exosomas derivados de las líneas T47D-CXCR4 y HCC38, y del grupo de pacientes con cáncer de mama de “Peor Pronóstico”.

9. Los exosomas aislados del plasma de pacientes con cáncer de mama presentan marcadores relacionados con pluripotencialidad y metástasis

Para proseguir con el estudio se aislaron los exosomas del plasma de forma individual de una serie de 173 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama. De la misma manera que para los medios de cultivo, los exosomas se identificaron por microscopía electrónica de transmisión (**véase Figura 9A**), por el sistema NanoSight (**véase Figura 9B**) y, en último lugar, se caracterizaron por inmunotransferencia evaluando los marcadores proteicos CD63, CD81 y Calnexina como control negativo de exosomas (**véase Figura 9C**).

Con el objetivo de realizar un estudio global con valor pronóstico de los genes implicados en pluripotencialidad y metástasis potencialmente regulados por el material genético vehiculado en los exosomas aislados del plasma de pacientes con cáncer de mama, se realizaron los dos *RT²-ProfilerTM PCR Arrays* descritos anteriormente. Primeramente, se procedió a clasificar a los pacientes en dos grupos diferentes en base a la evolución de la enfermedad presentada. De tal manera que el primer grupo de 5 enfermas que se denominó de “buen pronóstico”, integrado por pacientes que no habían presentado recaída ni muerte por la enfermedad, con una supervivencia global importante, con un seguimiento medio de 119 meses. El segundo grupo estaba formado por otras 5 pacientes que se denominó de “mal pronóstico”, en el que las enfermas tuvieron recaída precoz, supervivencia libre de enfermedad corta y muerte por la enfermedad con un seguimiento medio de 17 meses.

Según los resultados de los *PCR Arrays*, en el análisis del perfil de los exosomas procedentes de pacientes con mal pronóstico y de los exosomas derivados de pacientes con buen pronóstico, se identificaron 8 ARNms implicados en metástasis y 27 ARNms involucrados en pluripotencia, los cuales presentaron mayores niveles relativos en los exosomas de los pacientes con peor pronóstico respecto a los de buen pronóstico. Teniendo en cuenta este conjunto de datos, en la **Figura 15** se ilustran los genes que fueron comunes para las células T47D que sobreexpresan CXCR4, para las HCC38 y para el grupo de pacientes con peor pronóstico. Conforme a este criterio se seleccionaron los seis genes candidatos (*NANOG*, *NEUROD1*, *HTR7*, *KISS1R*, *HOXC6*) que presentaron mayores niveles en los exosomas aislados a partir del grupo de los pacientes con mal pronóstico e incrementados también en los exosomas de las células T47D-CXCR4 y HCC38, según los datos del *PCR Array*. Finalmente, se

llevó a cabo la validación de cinco respecto al total de genes candidatos en los exosomas procedentes del plasma de la serie externa de 173 pacientes con cáncer de mama mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. Se detectó la presencia del ARNm de *NANOG* en el 97,1% de los pacientes, de *NEUROD1* en el 93,1% de los pacientes, de *HTR7* en el 93,6%, de *KISS1R* en el 84,4% y de *HOXC6* en el 98,3% de los pacientes.

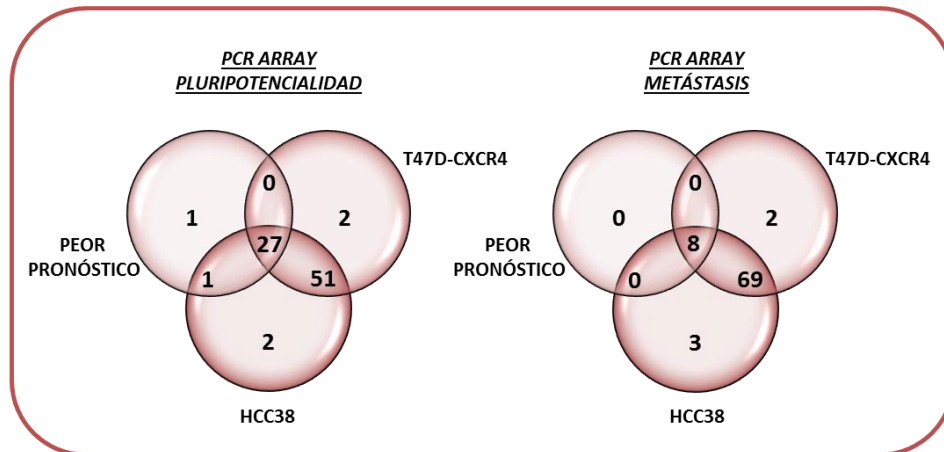


Figura 15. Los exosomas aislados del plasma de pacientes con cáncer de mama presentan marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis. Diagrama que ilustra el número de genes relacionados con pluripotencialidad y metástasis que fueron comunes para las líneas celulares T47D-CXCR4 y HCC38, y para el grupo de pacientes con cáncer de mama de “Peor Pronóstico”.

10. Asociación de la expresión de los marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas con una peor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama.

Para determinar el valor pronóstico de cada uno de los genes seleccionados en exosomas, se evaluaron las posibles asociaciones entre los niveles relativos de los ARNm de *NANOG*, *NEUROD1*, *HTR7*, *KISS1R* y *HOXC6* en los exosomas de la serie de validación de plasmas de pacientes con cáncer de mama y unos parámetros de mal pronóstico del tumor, así como la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. El seguimiento medio de la serie fue de 73 meses (rango de seguimiento 1-136 meses). Los distintos análisis (*Kaplan-Meier* y *Cox* univariante y multivariante) de los niveles relativos de los ARNm de los genes de exosomas y los datos de supervivencia de los pacientes mostraron importantes asociaciones estadísticas. De este modo, se demostró una correlación estadísticamente significativa entre los elevados niveles relativos de ARNm de los genes evaluados en exosomas (*NANOG*, *HTR7*, *NEUROD1* y *HOXC6*) y una peor supervivencia global (SG). Asimismo, se observó la misma

tendencia a la significación entre los altos valores de ARNm de *KISS1R* con una menor SG (Figura 16, Tabla IX).

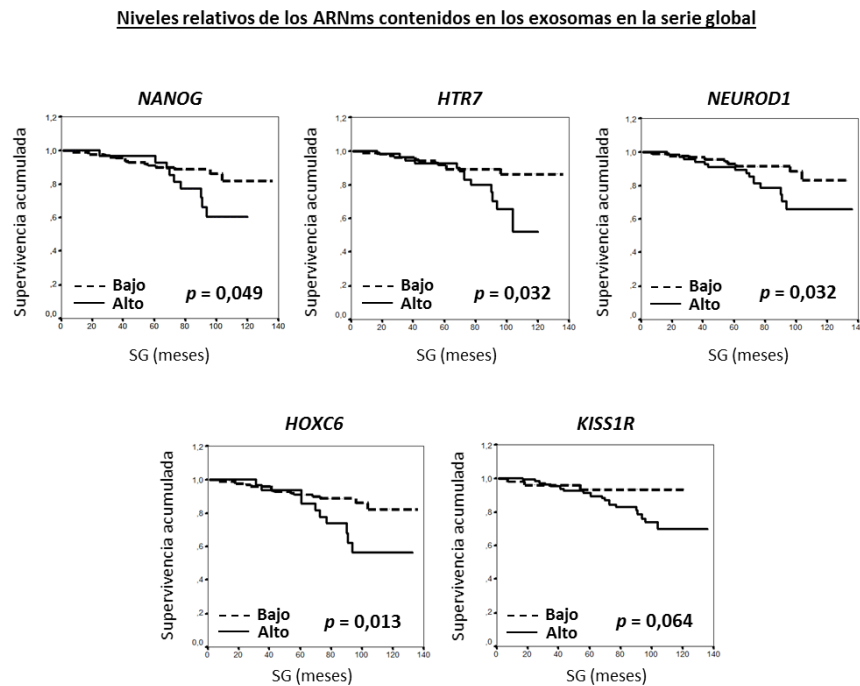


Figura 16. Asociación de la expresión de los marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas con una peor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (SG) y valores de *p*. Los niveles de expresión de cada uno de los ARNm contenidos en exosomas se distribuyeron en bajos y altos niveles de expresión. SG, supervivencia global.

ARNm		% SLE (95% IC) 100 meses	<i>p</i>	% SG (95% IC) 100 meses	<i>p</i>
SERIE GLOBAL	HTR7				
	Bajo	84,07% (76,56-91,57%)	0,003	86,39% (78,04-94,73%)	0,032
	Alto	53,81% (36,66-70,96%)		65,31% (47,37-83,24%)	
	NEUROD1				
	Bajo	81,43% (72,37-90,48%)	0,027	88,25% (79,76-96,73%)	0,032
	Alto	63,92% (49,96-77,87%)		65,86% (82,04-49,67%)	
	HOXC6				
	Bajo	80,1% (72,4-87,7%)	0,019	82,3% (72,1-92,5%)	0,013
	Alto	53% (33,2-72,7%)		56,5% (35,1-77,8%)	
	NANOG				
	Bajo	78,6% (70,88-86,36%)	0,076	86,1% (78,4-93,7%)	0,049
	Alto	54,05% (31,25-76,84%)		60,3% (39,2-81,4%)	
	KISS1R				
	Bajo	81,27% (67,86-94,68%)	NS	93,47% (86,27-100%)	0,064
	Alto	71,23% (61,67-80,79%)		73,49% (62,31-84,66%)	

Tabla IX. Asociación de la expresión de los marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas con una peor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad.

En cuanto al análisis de la supervivencia libre de enfermedad (SLE), se observó que los pacientes con mayores niveles de expresión de ARNm de *HTR7*, *NEUROD1* y *HOXC6* en los exosomas se correlacionaron significativamente con una menor SLE, excepto para *KISS1R*.

El marcador *NANOG* presente en exosomas mostró una clara tendencia en el mismo sentido con respecto a la SLE (**Figura 17**, véase **Tabla IX**).

Niveles relativos de los ARNm contenidos en los exosomas en la serie global

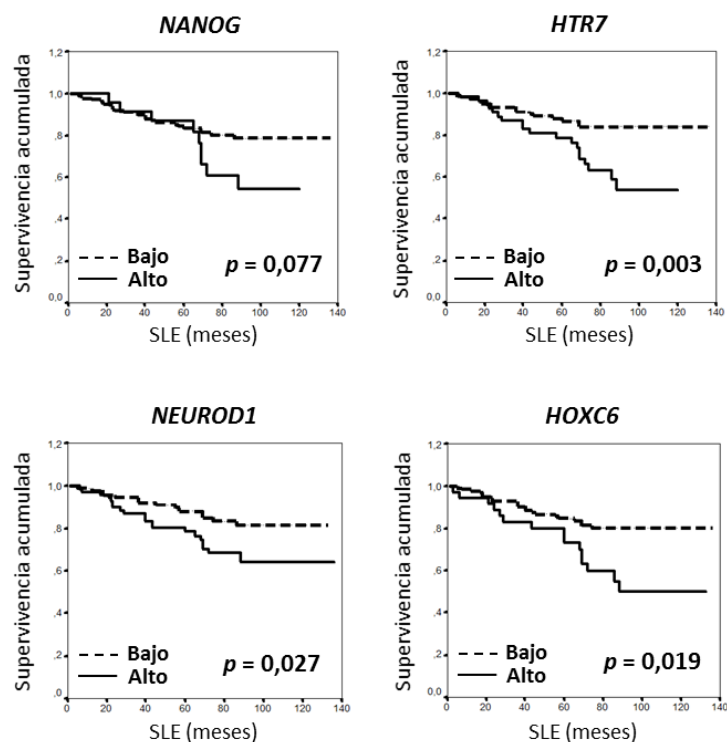


Figura 17. Asociación de la expresión de los marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas con una peor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (SLE) y valores de p . Los niveles de expresión de cada uno de los ARNm contenidos en exosomas se distribuyeron en bajos y altos niveles de expresión. SG, supervivencia global. SLE, supervivencia libre de enfermedad.

Considerándose únicamente aquellos pacientes de la serie global con tumores de mama positivos para receptores hormonales, se observó una SG más corta para los cinco genes estudiados (*NANOG*, *HTR7*, *NEUROD1*, *HOXC6* y *KISS1R*) (**Figura 18**, **Tabla X**).

**Niveles relativos de los ARNm contenidos en los exosomas en pacientes
de la serie global con receptores hormonales positivos**

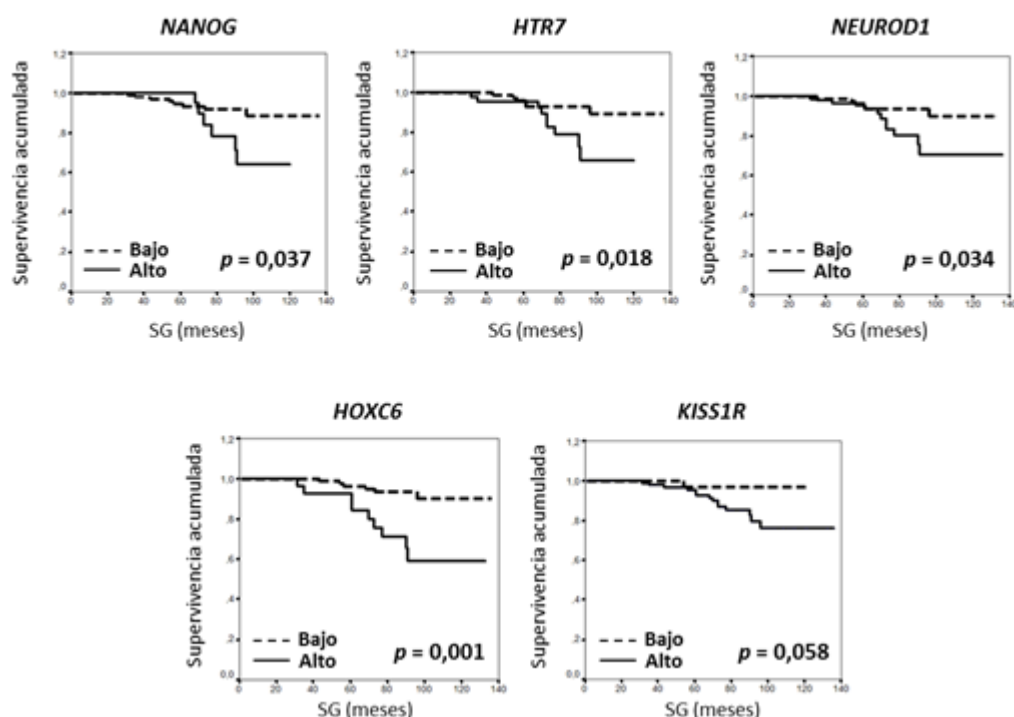


Figura 18. Asociación de la expresión de los marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas con una peor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. Consideramos únicamente los pacientes de la serie global con receptores hormonales positivos. Curvas de supervivencia de *Kaplan-Meier* (SG) y valores de *p*. Los niveles de expresión de cada uno de los ARNm contenidos en exosomas se distribuyeron en bajos y altos niveles de expresión. SG, supervivencia global.

ARNm		% SLE (95% IC) 100 meses	<i>p</i>	% SG (95% IC) 100 meses	<i>p</i>
RECEPTORES HORMONALES POSITIVOS	HTR7				
	Bajo	86,72% (78,95-94,48%)	0,005	89,47% (80,55-98,38%)	0,018
	Alto	55,95% (35,17-76,72%)		65,78% (45,39-86,16%)	
	NEUROD1				
	Bajo	83,72% (74,25-93,18%)	NS	89,82% (80,39-99,24%)	0,034
	Alto	68,26% (52,24-84,27%)		70,44% (53,50-87,37%)	
	HOXC6				
	Bajo	85,8% (78,1-93,4%)	<0,001	90,1% (81,4-98,7%)	0,001
	Alto	48,7% (27,7-69,6%)		59,2% (37,8-80,5%)	
	NANOG				
	Bajo	82,29% (74,11-90,46%)	0,073	88,61% (80,18-97,03%)	0,037
	Alto	57,57% (32,85-82,28%)		40% (0-98,13%)	
	KISS1R				
	Bajo	81,59% (66,49-96,68%)	NS	96,67% (90,24-100%)	0,057
	Alto	76,26% (66,14-86,37%)		76,40% (64,42-88,37%)	

Tabla X. Asociación de la expresión de los marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas con una peor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. Consideramos únicamente los pacientes de la serie global con receptores hormonales positivos. SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad.

En relación a la SLE se determinó una asociación estadísticamente significativa con los mayores niveles de expresión de ARNm de *HTR7* y *HOXC6*, mientras que en relación a *NANOG* se mostró únicamente una tendencia hacia una SLE más corta (**Figura 19**, véase **Tabla X**).

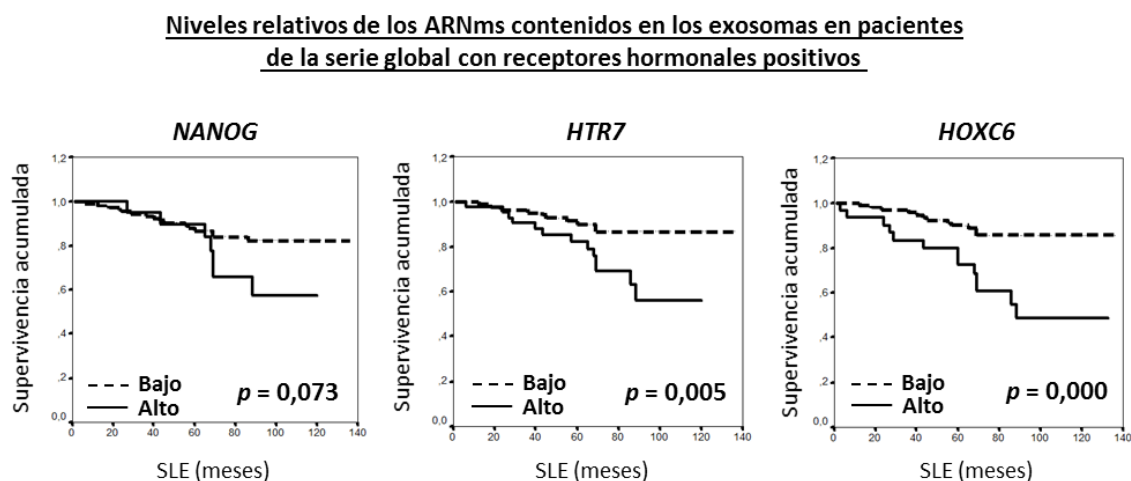
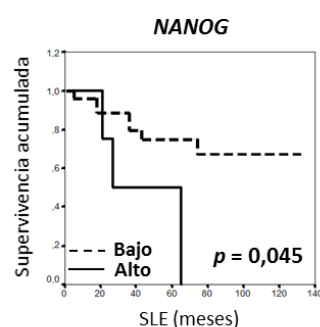


Figura 19. Asociación de la expresión de los marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas con una peor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. Consideramos únicamente los pacientes de la serie global con receptores hormonales positivos. Curvas de supervivencia de *Kaplan-Meier* (SLE) y valores de *p*. Los niveles de expresión de cada uno de los ARNms contenidos en exosomas se distribuyeron en bajos y altos niveles de expresión. SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad.

Teniendo en cuenta los pacientes con tumores de mama positivos para HER2, se observó una peor evolución de la enfermedad (SLE) en pacientes con elevados niveles de *NANOG*. Analizando los pacientes con tumores de mama negativos para HER2, mayores niveles de expresión de *HTR7* en exosomas se correlacionaron con una SLE más corta, y niveles aumentados de *HOXC6* en exosomas se asociaron con una SLE y una SG menores (**Figura 20**, **Tabla XI**).

Niveles relativos de los ARNm contenidos en los exosomas en pacientes de la serie global con HER2 positivo



Niveles relativos de los ARNm contenidos en los exosomas en pacientes de la serie global con HER2 negativo

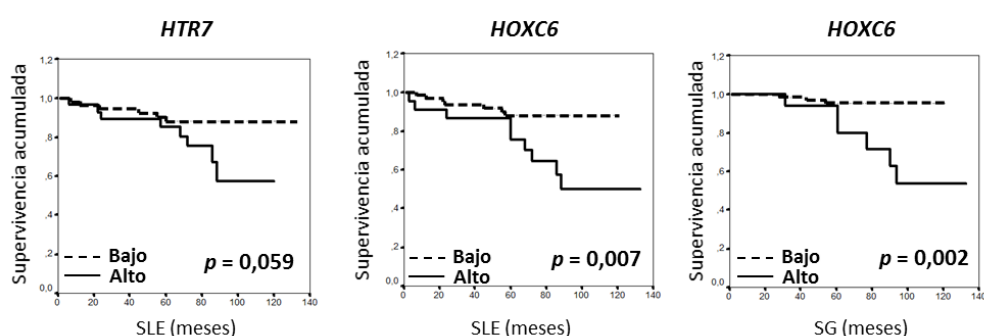


Figura 20. Asociación de la expresión de los marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas con una peor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. Consideramos únicamente los pacientes de la serie global con HER2 positivo por un lado, y HER2 negativo por otro. Curvas de supervivencia de *Kaplan-Meier* (SG y SLE) y valores de *p*. Los niveles de expresión de cada uno de los ARNm contenidos en exosomas se distribuyeron en bajos y altos niveles de expresión. SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad.

		ARNm	% SLE (95% IC) 100 meses	<i>p</i>	% SG (95% IC) 100 meses	<i>p</i>
HER2	NEGATIVO	<i>HTR7</i>		0,059	89,68% (81,03-98,32%) 69,69% (41,74-97,63%)	NS
		Bajo	88,04% (78,98-97,09%)			
		Alto	57,49% (31,89-87,08%)			
		<i>HOXC6</i>				
	Bajo	88,1% (79,6-96,5%)	0,007	95,3% (90,2-100%) 53,8% (25,7-81,8%)	0,002	
	Alto	50% (25,9-74,1%)				
	<i>NANOG</i>					
	Bajo	67,44% (46,38-88,49%)				0,045
Alto	0% (0%)					

Tabla XI. Asociación de la expresión de los marcadores relacionados con pluripotencia y metástasis en exosomas con una peor supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. Consideramos únicamente los pacientes de la serie global con HER2 positivo por un lado, y HER2 negativo por otro. SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad.

11. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencialidad y metástasis” en exosomas con una peor evolución clínica de la enfermedad.

Para estudiar el posible efecto aditivo de los ARNm seleccionados como una firma de “pluripotencialidad y metástasis” en exosomas, los pacientes fueron agrupados acorde al número de ARNm con elevados niveles en exosomas. Por tanto, en primer lugar, los pacientes se unificaron en base a la expresión de cero, uno, dos, tres, cuatro o cinco ARNm. Las curvas de *Kaplan-Meier* mostraron una correlación estadísticamente significativa entre menor supervivencia y pacientes con cáncer de mama que presentaban mayor número de marcadores con elevados niveles.

A continuación, para establecer una dicotomía en el análisis, y en función de la semejanza en el comportamiento matemático, los pacientes con alta expresión de cero, uno o dos ARNm se agruparon como marcadores de “bajos niveles”, frente a aquellos con tres o más ARNm, clasificados como marcadores de “altos niveles”. De forma muy destacada, estos nuevos datos demostraron que las asociaciones encontradas con la SLE y la SG de los pacientes con cáncer de mama fueron más robustas en comparación a los marcadores analizados de manera individual (**Figura 21, Tabla XII**).

Niveles relativos de los ARNm de la firma de “pluripotencialidad y metástasis” contenidos en los exosomas en la serie global

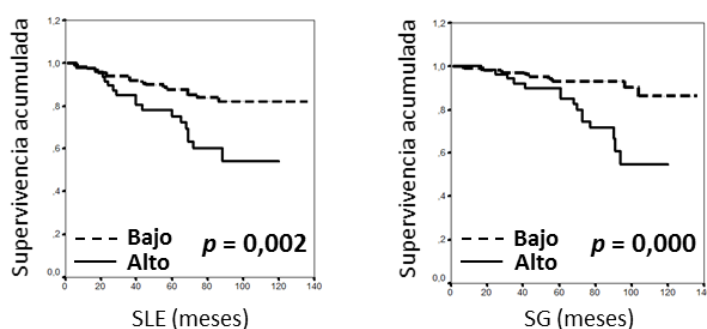


Figura 21. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas con una peor evolución clínica de la enfermedad. Curvas de supervivencia de *Kaplan-Meier* (SG y SLE) y valores de p Los pacientes con alta expresión de cero, uno o dos ARNm se agruparon como marcadores de “bajos niveles de expresión” frente a aquellos con tres o más ARNm clasificados como marcadores de “altos niveles”. SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad.

	ARNm	% SLE (95% IC) 100 meses	<i>p</i>	% SG (95% IC) 100 meses	<i>p</i>
SERIE	firma				
	Bajo	82,2% (74,2-90,1%)	0,002	90,3% (83,2-97,5%)	<0,001
GLOBAL	Alto	54,1% (36,2-72,1%)		54,8% (35%-74,6%)	

Tabla XII. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas con una peor evolución clínica de la enfermedad. Los pacientes con alta expresión de cero, uno o dos ARNms se agruparon como marcadores de “bajos niveles de expresión” frente a aquellos con tres o más ARNms clasificados como marcadores de “altos niveles”. SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad.

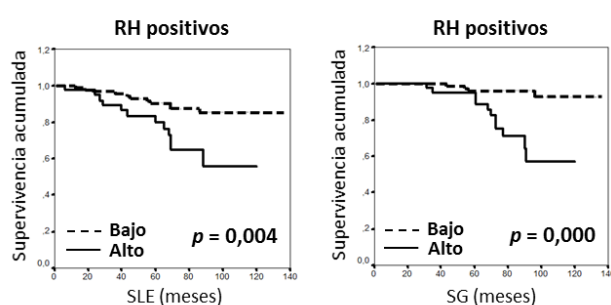
Estos resultados fueron confirmados con el modelo de regresión de Cox, lo que mostró un valor pronóstico independiente para esta firma (junto con las variables con valor pronóstico independiente para la SLE y la SG, **Tabla XIII**).

	Variable	Categoría	Análisis Ajustado		
			Tasa de Riesgo	95% IC	<i>p</i> valor
SLE	RP	Positivo vs Negativo	0,28	0,11-0,74	0,010
	HER2	Positivo vs Negativo	3,53	1,2-10,2	0,020
	RT	Progresión vs Completa	23,13	5,05-106,08	<0,001
	Nivel Firma	Alto vs Bajo	2,68	0,95-7,53	0,062
SG	IVL	Sí vs No	5,52	2,03-15,04	0,001
	RH	Positivo vs Negativo	0,16	0,06-0,42	<0,001
	RT	Progresión vs Completa	18,15	2,04-161,65	0,009
	Nivel Firma	Alto vs Bajo	5,77	2,23-14,95	<0,001

Tabla XIII. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas con una peor evolución clínica de la enfermedad. Análisis Multivariante de Cox de la asociación entre la firma de “pluripotencia y metástasis” y la SG y la SLE de los pacientes con cáncer de mama. SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; IC, intervalos de confianza. IVL, invasión vascular y linfática. RH, receptores hormonales; RP, receptor de progesterona; RT, respuesta al tratamiento.

Considerando solamente los pacientes con tumores de mama positivos para receptores hormonales por un lado, y negativos para HER2 por otro, una SLE y una SG más cortas se correlacionaron de manera significativa con más de 3 marcadores elevados, constituyentes de la firma de “pluripotencialidad y metástasis” exosomal (**Figura 22**, véase **Tabla XIV**).

Niveles relativos de los ARNm de la firma de “pluripotencialidad y metástasis”



Niveles relativos de los ARNm de la firma de “pluripotencialidad y metástasis”

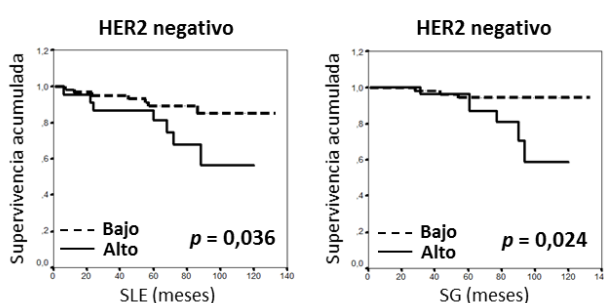


Figura 22. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas con una peor evolución clínica de la enfermedad. Curvas de supervivencia de *Kaplan-Meier* (SG y SLE) y valores de *p*. Los pacientes con alta expresión de cero, uno o dos ARNm se agruparon como marcadores de “bajos niveles de expresión” frente a aquellos con tres o más ARNm clasificados como marcadores de “altos niveles”. Se consideraron sólo los pacientes con tumores de mama positivos para RH por un lado, y negativos para HER2 por otro. SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; RH, receptores hormonales.

ARNm		% SLE (95% IC) 100 meses	<i>p</i>	% SG (95% IC) 100 meses	<i>p</i>
firma					
RH +	Bajo	85,4% (77,3-93,6%)	0,004	92,79% (85,16-100%)	<0,001
	Alto	55,7% (33,3-78,0%)		56,98% (35,06-78,89%)	
firma					
HER2 -	Bajo	85,25% (74,27-96,22%)	0,035	94,62% (86,68-100%)	0,024
	Alto	56,62% (29,4-83,84%)		58,81% (29,80-87,81%)	

Tabla XIV. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas con una peor evolución clínica de la enfermedad. Los pacientes con alta expresión de cero, uno o dos ARNm se agruparon como marcadores de “bajos niveles de expresión” frente a aquellos con tres o más ARNm clasificados como marcadores de “altos niveles”. Se consideraron sólo los pacientes con tumores de mama positivos para RH por un lado, y negativos para HER2 por otro. SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; RH, receptores hormonales.

Por último, tal y como muestra la **Tabla XV** se observó una asociación estadísticamente significativa entre los niveles en exosomas de la firma de “pluripotencialidad y metástasis” con diversos parámetros clínico-patológicos indicativos de peor pronóstico, tales como la edad

($p=0,008$), la recidiva de los pacientes ($p<0,001$), el estado en la última revisión ($p<0,001$), y una tendencia a la significación con el estadio patológico ($p=0,056$).

		Firma de "Pluripotencia y Metástasis"		
		Bajos Niveles (%)	Altos Niveles (%)	<i>p</i>
Edad	<50 años	27,7	6,9	0,008
	≥50 años	39,3	26	
Estadio	I, II, IIIA	65,1	29	0,056
	IIIB, IV	5,8	3,6	
Recaída	No	57,8	20,2	<0,001
	Sí	9,2	12,7	
Estado actual	Sin enfermedad	56,7	19,9	<0,001
	Con enfermedad	2,9	4,1	
	<i>Exitus</i>	7	12,3	

Tabla XV. Asociación de la expresión de la firma relacionada con "pluripotencia y metástasis" en exosomas con una peor evolución clínica de la enfermedad. Correlaciones estadísticamente significativas entre los parámetros clínico-patológicos indicativos de peor pronóstico y los niveles en exosomas de la firma de "pluripotencia y metástasis".

No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre la expresión de la firma exosomal y otras variables clínico-patológicas, incluyendo el tamaño del tumor, el grado histológico, la invasión vascular, metástasis en ganglios linfáticos y la presencia de distintos receptores (**Tabla XVI**).

		Firma de "Pluripotencia y Metástasis"		
		Bajos Niveles (%)	Altos Niveles (%)	<i>p</i>
IVL	No	45,5	19,5	NS
	Sí	21,4	13,6	
Bilateralidad	No	65,7	31,9	NS
	Sí	1,2	1,2	
Tamaño tumoral	≤2 cm	36,1	16,6	NS
	>2 cm	31,4	16	
Afectación ganglionar	No	39,3	18,4	NS
	Sí	27	33,7	
Grado	I	14,8	7,1	NS
	II	25,8	12,3	
	III	25,2	14,8	

RE	negativo	14,5	7,2	NS
	positivo	52,4	25,9	
RP	negativo	19,5	9,1	NS
	positivo	48,2	23,2	
HER2	negativo	49,6	24	NS
	positivo	19,8	6,6	
p53	negativo	50	20,3	NS
	positivo	17,5	12,6	
Ki67	negativo	22	8,4	NS
	positivo	45,8	23,9	
Bcl-2	negativo	16,7	8	NS
	positivo	52	23,3	
RT	respuesta	66,9	31,2	NS
	no respuesta	1,9		

Tabla XVI. Asociación de la expresión de la firma relacionada con “pluripotencia y metástasis” en exosomas con una peor evolución clínica de la enfermedad. Correlaciones estadísticamente no significativas entre los parámetros clínico-patológicos indicativos de peor pronóstico y los niveles en exosomas de la firma de “pluripotencia y metástasis”. IVL, invasión vascular y linfática; RE, receptor de estrógenos; RP, receptor de progesterona; RT, respuesta al tratamiento; NS, no significación.

En conjunto, estos resultados definen una firma génica relacionada con pluripotencialidad y metástasis contenida en exosomas extraídos del plasma de pacientes con cáncer de mama asociada con una peor evolución de la enfermedad.

DISCUSIÓN

La identificación y detección de marcadores moleculares es un tema de máximo interés para el diagnóstico de las enfermedades, así como para definir el estado de la patología y para predecir la respuesta de los pacientes a los tratamientos. La cuestión alcanza su más alto nivel en aquellas enfermedades que por complejidad y alta prevalencia necesitan un diagnóstico precoz, y/o clasificar a los pacientes en función de los tratamientos más eficaces.

Se puede afirmar que han sido muchos e importantes los avances que en cáncer se han producido durante los últimos años. Fundamentalmente, estos avances han estado dirigidos en la línea de una oncología cada vez más precisa gracias a una mejor comprensión de la biología molecular de los tumores. Es cada vez mayor el conocimiento de genes relacionados con el cáncer y de vías moleculares lo que ha llevado al descubrimiento de nuevos subtipos de cáncer y también a la mejor interpretación de la interacción entre el tumor y su microambiente. Todo esto ha conducido a obtener mejores resultados en los tratamientos dirigidos contra las células tumorales, con menos efectos adversos en general que la clásica quimioterapia. En este sentido, gracias al desarrollo de nuevas herramientas de análisis masivo, tanto a nivel genómico como proteómico, y a la bioinformática, se están generando nuevas clasificaciones de tumores con subtipos de pronóstico y abordaje terapéutico muy diferentes. Se encuentra en estudio el fenómeno de la heterogeneidad tumoral y su impacto en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, avanzando en la optimización de la obtención de muestras tumorales y la posterior determinación molecular. La estrategia de combinación de diferentes tipos de terapias ha conseguido una mayor eficacia en algunos casos, como por ejemplo en tumores cerebrales. En definitiva, todo ello se encamina al avance en los distintos ámbitos: prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer.

En las últimas décadas se ha demostrado notoriamente la presencia de ácidos nucleicos de origen tumoral en sangre periférica. Se ha observado que al menos parte del ARNm, los microARNs y el ADN circulantes en el plasma se encuentran protegidos en exosomas liberados activamente por las células tumorales (Valadi *et al.*, 2007; García *et al.*, 2008; Skog *et al.*, 2008; Thakur *et al.*, 2014; Wang y Lotze, 2014). Los exosomas son el vehículo de un mecanismo de comunicación intercelular, capaces de transferir su contenido a células receptoras, manteniéndose funcional la información transmitida y afectando a la célula diana (Simons y Raposo, 2009). Se ha descrito que los exosomas modifican la capacidad tumorigénica del tumor, por lo que en la evolución del mismo los exosomas están

funcionalmente implicados en favorecer la diseminación local y la metástasis (Park *et al.*, 2010; Atay y Godwin, 2014).

En relación con el proceso metastático, existen teorías en las que están implicadas directamente las células madre tumorales (Rosen y Jordan, 2009; Clevers, 2011; Martín-Belmonte y Pérez-Moreno, 2012), las cuales representan la pequeña tasa de células dentro de los tumores (0.1-0.0001%) que se distinguen del resto de células por la asimetría de su división celular y por alteraciones en su expresión genética (Rosen y Jordan, 2009), siendo capaces de originar y consolidar una metástasis. Las células tumorales con elevada capacidad de pluripotencialidad poseen habilidad de autorrenovación, pueden originar las diferentes estirpes celulares que componen un tumor, necesitan un microambiente o nicho para desarrollarse, el eje SDF-1/CXCR4 está implicado en la migración de las mismas, evaden el fenómeno de apoptosis y muestran resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia (Clarke *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2010; Floor *et al.*, 2011; Nigam *et al.*, 2013; Ogawa *et al.*, 2013). Es posible que la capacidad de crecimiento de la metástasis esté relacionada con un adecuado microambiente en el órgano diana, siendo elegidos aquellos órganos con un acondicionamiento preexistente o bien pueda ser que el tumor primario lo genere utilizando mecanismos a distancia en los que podría estar implicada la comunicación intercelular mediada por exosomas. Así pues, es posible que exista una implicación funcional de los exosomas liberados por las células de un tumor en alguno de estos mecanismos.

El microambiente tumoral es particularmente importante para las CSCs, ya que sus interacciones con los elementos estromales constituyen el nicho de las células madre (Garnier *et al.*, 2012; Barcellos-Hoff *et al.*, 2013; Green *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). El conocimiento del proceso de activación y la caracterización molecular de las intercomunicaciones entre células tumorales y estromales, podrían ser útiles en la identificación de nuevos marcadores con valor pronóstico y nuevos blancos para la acción de antitumorales. Como consecuencia, la modificación del estroma mediante tratamientos clínicos podría mejorar la supervivencia de los pacientes.

Con estos antecedentes como punto de partida del presente trabajo de doctorado, se trata de determinar si el material genético protegido en exosomas liberados por las células tumorales tiene como objetivo proporcionar al tumor una mayor capacidad de crecimiento y diseminación, y si varía en función de la capacidad metastásica y pluripotencial de las células tumorales de las que provienen, analizando el papel de CXCR4 en estos mecanismos. Se ha

realizado un estudio molecular en una serie de pacientes con cáncer de mama evaluando el valor pronóstico de los genes identificados.

Debido a la complejidad y heterogeneidad que existe en cáncer de mama es difícil encontrar un modelo que recapitule todos los aspectos de la enfermedad. No obstante, se consideró fundamental seleccionar líneas celulares que se ajustasen en gran medida a las características de pluripotencia y metástasis con el objetivo de representar el entorno celular en los modelos animales. De este modo se determinó la idoneidad de la línea de cáncer de mama con baja capacidad de pluripotencia y metástasis, T47D, y la segunda con alta capacidad de pluripotencia y metástasis, MDA-MB-231 (Holliday y Speirs, 2011).

1. Las células de cáncer de mama que expresan CXCR4 presentan un marcado efecto sobre el comportamiento de los tumores

Es un hecho fascinante y muy conocido la órgano-especificidad de las metástasis, sabiendo que las moléculas que regulan selectivamente el proceso de diseminación tumoral en ciertos órganos deben cumplir los siguientes criterios: (i) las moléculas deben expresarse de manera constitutiva en los principales sitios de metástasis; (ii) deben suscitar la adhesión de las células diana al endotelio y promover la migración transendotelial; (iii) dichas moléculas serán capaces de mediar la invasión de las células en los tejidos y proporcionar un microambiente de soporte; (iv) este proceso requiere la expresión de un amplio abanico de receptores en las células diana, dependiendo de su perfil metastásico (Müller *et al.*, 2001).

En este estudio se ha expresado de manera exógena *CXCR4*, un receptor de quimioquinas que pertenece a los *GPCRs*, y tiene como ligando específico CXCL12 (SDF-1). El eje CXCL12/CXCR4 está implicado en varios aspectos de la progresión tumoral incluyendo angiogénesis, metástasis y supervivencia (Kryczek *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Gassmann *et al.*, 2009; Teicher y Fricker, 2010; Boimel *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; Mego *et al.*, 2016). *CXCR4* es el receptor de quimioquinas más ampliamente expresado en células tumorales, y junto con su ligando CXCL12, tiene una gran importancia en el desarrollo del proceso metastásico del cáncer de mama (Liotta, 2001; Müller *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Zlotnik *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014; Hoshino *et al.*, 2015). En dicha neoplasia maligna con capacidad metastásica, una vez que el tumor primitivo ha invadido las matrices extracelulares locales, las células tumorales que expresan el receptor *CXCR4* podrán migrar a lugares

distantes del organismo, para establecer focos secundarios preferentemente en los diversos órganos (ganglios linfáticos, pulmón, hígado, médula ósea y cerebro) que expresan constitutivamente y de manera significativa su ligando SDF-1, donde finalmente las células tumorales proliferarán en el espacio extravascular y producirán depósitos tumorales secundarios (Kang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Minn *et al.*, 2005; Lu y Kang, 2007; Furusato *et al.*, 2010; Weilbaeher *et al.*, 2011; Ghajar *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2015; Kholia *et al.*, 2016).

Cabe destacar que CXCR4 además de jugar un papel principal en el proceso de metástasis en el cáncer de mama, se sobreexpresa en las CSCs promoviendo el mantenimiento y la diseminación de las mismas (Furusato *et al.*, 2010; Mukherjee y Zhao, 2013; Cojoc *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Según lo comentado anteriormente, sólo un pequeño porcentaje de las células tumorales que penetran en el torrente circulatorio sobreviven, adaptándose a un nuevo microambiente y formando metástasis. Es evidente que esta subpoblación de células tumorales con características de célula madre es competente para iniciar el crecimiento tumoral, diseminarse a órganos distales y resistir a la terapia (Reya *et al.*, 2001; Croker y Allan, 2008; Charafe-Jauffret *et al.*, 2009; Shekhani *et al.*, 2013; Cojoc *et al.*, 2013). La capacidad de las CSCs para migrar al nicho premetastásico explica que en numerosos casos, a pesar de extirpar el tumor primario, la metástasis aparezca clínicamente hasta años después (Mukherjee y Zhao, 2013; Adorno-Cruz *et al.*, 2015).

Varios estudios sugieren una correlación directa entre las propiedades de las CSCs y el proceso TEM (Brabletz *et al.*, 2005; Wu y Yang, 2011; Hindriksen y Bijlsma, 2012). Además, la actividad de las CSCs está asociada a las características epitelio-mesenquimales, ya que la heterogeneidad intratumoral de dichas células se refleja en parte por el grado de activación de la TEM (Lamouille *et al.*, 2014; Ferrao *et al.*, 2015). En este sentido se ha descrito que en pacientes con cáncer de próstata, las células tumorales circulantes (CTCs, del inglés, *Circulating Tumor Cells*) coexpresan el marcador de célula troncal CD133, con proteínas de origen mesenquimal como vimentina, N-cadherina y O-cadherina (Armstrong, 2011). En pacientes con cáncer de mama metastásico, el estudio de las CTCs revela que el 62% de las células fueron positivas para, al menos, uno de los tres marcadores de la TEM (Twist1, AKT2, PI3K α), y el 69% del total de la población de CTCs fueron positivas para el marcador de CSC, ALDH (Aktas *et al.*, 2009; Mego *et al.*, 2016). El papel de CXCR4 en el contexto de las CSCs se ha descrito en numerosos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de páncreas (Hermann *et al.*, 2007), cáncer colorrectal (Zhang *et al.*, 2012), cáncer de riñón (Gassenmaier *et al.*, 2013), tumor cerebral

(Zheng *et al.*, 2011), cáncer de pulmón (Jung *et al.*, 2013), cáncer de próstata (Dubrovskaya *et al.*, 2012) y melanoma (Fusi *et al.*, 2012).

En consonancia con todo lo descrito sobre el receptor de quimioquinas CXCR4, en este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de CXCR4 en base a la sobreexpresión del gen en distintos modelos celulares de mama con baja y/o alta capacidad de pluripotencialidad (T47D, MDA-MB-231 y HCC38), a través de un abordaje tanto *in vitro* como *in vivo*. Mediante la expresión exógena de *CXCR4* en líneas celulares con baja capacidad de pluripotencialidad, se ha estudiado su capacidad para inducir el fenotipo tumoral y su participación en los eventos de la carcinogénesis. Siguiendo la misma dirección, los resultados de nuestro estudio muestran que las células que sobreexpresan *CXCR4* presentan las características de la TEM, una elevada expresión de marcadores de superficie y de genes relacionados con pluripotencialidad, incremento en la proliferación, en la migración y en la invasión, al compararse con las células control.

Estudios previos realizados con la línea celular tumoral de mama MCF-7 en modelos *in vivo*, describen que la sobreexpresión de CXCR4 promueve el potencial metastásico con independencia de los estrógenos (Reya *et al.*, 2001; Rhodes *et al.*, 2011; Shekhani *et al.*, 2013).

Este es el primer estudio que demuestra *in vivo*, que la línea tumoral de mama con baja capacidad pluripotente y metastásica T47D que sobreexpresa *CXCR4* es capaz de desarrollar un tumor primario en ratones inmunodeprimidos en comparación con las células control, sugiriendo el papel tan relevante de CXCR4 en el crecimiento tumoral. Dicho diseño experimental se realizó con independencia de los estrógenos.

Teniendo en cuenta el otro modelo celular, la velocidad de crecimiento de los tumores generados por la línea tumoral MDA-MB-231 hormono-independiente que sobreexpresa CXCR4 fue mayor respecto a la de los tumores procedentes de la inoculación con las células control.

Se puede concluir que los resultados obtenidos en modelos celulares y en modelos animales durante el desarrollo de esta primera parte del trabajo, apoyan que la expresión de *CXCR4* promueve la capacidad tumorigénica y metastásica de las células de carcinoma de mama.

2. Los exosomas liberados por las células de cáncer de mama que expresan CXCR4 potencian la tumorigénesis

La heterogeneidad funcional y fenotípica de las células tumorales representa uno de los retos más importantes en el éxito deseado de las terapias anticancerígenas actuales, ya que el riesgo se ve incrementado debido a la habilidad de metastatizar y de tolerar la citotoxicidad de los fármacos por parte de las células tumorales. Esta disparidad en el comportamiento celular está impulsada por los cambios genéticos y epigenéticos, y las diferencias ambientales. Un gran número de estudios han descrito que existe una cuestión adicional a tener en cuenta en este complejo escenario. Se basa en la capacidad de las células de comunicarse mediante vesículas extracelulares que engloban en su interior biomoléculas funcionales, siendo transferidas de un modo local o sistémico, y ejerciendo un efecto en el comportamiento de las células diana (Zomer y van Rheenen, 2016).

En la enfermedad del cáncer se ha descrito ampliamente cómo los exosomas promueven el crecimiento del tumor (Peinado *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2014; Roma-Rodrigues *et al.*, 2014; Costa-Silva *et al.*, 2015; Harris *et al.*, 2015; Munson y Shukla, 2015). Sin embargo, los exosomas también pueden presentar funciones antitumorales y actuar limitando la patogénesis de la enfermedad (Kalluri, 2016). De forma ineludible, es necesario realizar estudios adicionales para poder dilucidar la gran complejidad de los exosomas. Dichas nanovesículas y, en particular, su contenido son una gran fuente de información para el análisis y el conocimiento del cáncer, proporcionando información sobre la progresión tumoral y la metástasis.

En estos últimos años, los exosomas derivados de las células tumorales han emergido como mediadores sistémicos de la información oncogénica entre células a través de la transferencia horizontal de ARNms, microARNs, ADN y proteínas durante el desarrollo del proceso tumoral (Zhuang *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2012; Ge *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2014; Costa-Silva *et al.*, 2015; Whiteside, 2016). Estudios recientes han descrito que el contenido exosomal es biológicamente activo en la célula receptora, pudiendo alterar el destino final de ésta (Valadi *et al.*, 2007; Peinado *et al.*, 2012; Soldevilla *et al.*, 2014; Zomer *et al.*, 2015). Por ello, la identificación de la carga molecular de los exosomas es esencial para determinar su función durante etapas específicas del proceso tumoral. Los exosomas son capaces de influir en la mayoría de los mecanismos tumorales, tales como en la proliferación, en la angiogénesis, en la TEM, en la evasión del sistema inmune, en la capacidad pluripotente y metastásica, en la

resistencia frente a la terapia y, por último, en la interacción entre el tumor y el estroma circundante (Azmi *et al.*, 2013; EL Andaloussi *et al.*, 2013; Hoffman, 2013; Vella, 2014; Benito-Martín *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; De Toro *et al.*, 2015; Milane *et al.*, 2015; Chiarugi y Cirri, 2015; Greening *et al.*, 2015; Meehan y Vella, 2015; Kholia *et al.*, 2016).

Según las funciones descritas anteriormente en las que CXCR4 está implicado, las células-CXCR4 muestran características del proceso TEM, elevada expresión de diversos genes relacionados con pluripotencia y marcadores de superficie, alta capacidad de proliferación, migración e invasión, con respecto a las células control. Estos resultados están en consonancia con otros estudios realizados en líneas celulares de cáncer de mama transfectadas con CXCR4 (Xu *et al.*, 2013). Es interesante resaltar que nuestros resultados indican que los exosomas derivados de las células que sobreexpresan CXCR4 contribuyen a un mayor potencial tumorigénico en las células receptoras.

En conjunto, el diseño de los experimentos desarrollados *in vitro* muestran que los exosomas liberados por células-CXCR4 aumentan los marcadores de pluripotencialidad, los marcadores relacionados con TEM, la proliferación, la migración y la invasión en células receptoras.

En concordancia con esta premisa, nuestros experimentos *in vivo* realizados con ratones inmunodeprimidos a los que se les inocularon exosomas derivados de las células MDA-MB-231 que sobreexpresan CXCR4, incrementaron su potencial metastásico, en comparación con los ratones a los que se les inocularon exosomas liberados por las células control. Sin embargo, no hubo evidencias de crecimiento tumoral al inocular los exosomas derivados de la línea celular T47D-CXCR4 en los ratones inmunodeprimidos.

En conjunto, estos hallazgos conseguidos en la segunda parte de este trabajo, indican que los exosomas liberados por las células tumorales con propiedades pluripotentes y metastásicas son capaces de transferir estas funciones oncogénicas a las células receptoras.

3. Las pacientes con cáncer de mama y evolución desfavorable expresan una firma de ARNms contenida en exosomas asociada a pluripotencia y metástasis

En este trabajo, además de evaluar las funciones de los exosomas durante etapas específicas del proceso tumoral, se quiso estudiar su contenido molecular con el fin de determinar así su posible utilización como marcador pronóstico en el cáncer de mama.

En el desarrollo de esta tercera parte de nuestro estudio, identificamos una serie de ARNms específicos contenidos en los exosomas derivados de células T47D que sobreexpresan CXCR4, altamente enriquecidos y relacionados tanto con las características pluripotentes de las células madre como con la metástasis. Apoyando este resultado, es interesante destacar que dichos ARNms son altamente homólogos con el contenido de los exosomas derivados de la línea celular HCC38, una línea muy positiva para marcadores relacionados con la subpoblación de CSCs en cáncer de mama.

En consonancia con lo anterior, se analizaron dos grupos de pacientes con comportamientos diferentes en base a su evolución clínica, esto es, cinco pacientes con buen pronóstico y cinco pacientes con mal pronóstico. Al comparar los ácidos nucleicos contenidos en los exosomas procedentes del plasma de dichos pacientes, se identificaron numerosos ARNms relacionados con pluripotencialidad y metástasis, de los cuales se seleccionaron cinco (*NANOG*, *NEUROD1*, *HTR7*, *KISS1R*, *HOXC6*) para su posterior validación en una serie de pacientes, que también estaban incrementados en los exosomas derivados de las células que sobreexpresan CXCR4. De este modo, en la serie de validación observamos que los niveles de los ARNms en estos exosomas presentaban una correlación muy significativa con SLE y SG más cortas. Cuando tuvimos en consideración la firma de "pluripotencialidad y metastásis" englobando a los ARNms estudiados, esta relación fue más robusta.

Para estudiar el posible efecto aditivo de los ARNms seleccionados como la firma de "pluripotencialidad y metastásis", los pacientes se agruparon de acuerdo al número de ARNms que presentaban altos niveles de expresión en los exosomas obtenidos del plasma. Observamos una correlación significativa entre los pacientes que expresaban un mayor número de ARNms de la firma en los exosomas y supervivencias más desfavorables. Del mismo modo, al realizar una dicotomización de los pacientes de cáncer de mama respecto a la expresión de los ARNms constituyentes de la firma en "bajos niveles" o "altos niveles", la correlación observada anteriormente fue aún más significativa.

Del mismo modo y teniendo en cuenta el análisis multivariante, se demuestra claramente que la firma de "pluripotencialidad y metastásis" tiene valor pronóstico

independiente y relevancia clínica para poder evaluar el desarrollo clínico de los pacientes con cáncer de mama.

La selección de estos ácidos nucleicos contenidos en los exosomas se han relacionado con diversas funciones, tales como el crecimiento y la proliferación, la capacidad de pluripotencia y las CSCs, el mantenimiento de células madre adultas, el desarrollo embrionario, la simetría y la segmentación, y la morfogénesis de los órganos (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto v58.1, *KEGG*, del inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Osborne *et al.*, 2013; Mukherjee y Zhao, 2013; Rizzardi *et al.*, 2014; Savvidis *et al.*, 2015; Wiechert *et al.*, 2016).

En conclusión, estos resultados establecen la definición de una firma de "pluripotencialidad y metastásis" en exosomas con gran relevancia clínica, ya que muestra un notable valor pronóstico de la evolución clínica de los pacientes con cáncer de mama. Este hallazgo podría ayudar a predecir el resultado clínico, influyendo en la toma de decisiones en cuanto al tratamiento, sobre todo en los subgrupos moleculares con receptores hormonales positivos o HER2 negativo en cáncer de mama. Resulta, por tanto, necesario el avance en el conocimiento de dicha firma génica contenida en exosomas para valorar su papel predictivo.

4. Consideraciones finales

La investigación biomédica es imprescindible para la generación de conocimiento científico-técnico sobre los procesos celulares y moleculares. Esta constante innovación produce un flujo de nuevos datos y conceptos que, de forma específica, conllevan su propia capacidad de aplicación y valor clínico.

Las biopsias tisulares, aunque otorgan gran cantidad de información y son el estándar por excelencia para el diagnóstico tumoral, no pueden ser realizadas continuamente para monitorizar la evolución tumoral debido a que es un procedimiento invasivo, doloroso y costoso para el paciente. La biopsia líquida surge como una herramienta capaz de compensar estas limitaciones. Uno de los principales biomarcadores de la biopsia líquida son los exosomas. No cabe duda que en los últimos años los exosomas han surgido como una potente herramienta para comprender mejor la biología del cáncer, así como una forma para intentar

mejorar el manejo de los pacientes oncológicos en la práctica clínica (Sun y Liu, 2014; Heitzer *et al.*, 2015; Carvalho y Oliveira, 2015; Sáenz-Cuesta *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2015).

Este estudio propone que la comunicación intercelular a través de los exosomas estimula la progresión tumoral y la metástasis, principalmente cuando los exosomas son liberados por las células con propiedades pluripotentes y metastásicas en el cáncer de mama. Nuestro trabajo revela que los exosomas derivados de células que sobreexpresan *CXCR4* promueven la proliferación, la migración y la metástasis, además de generar un fenotipo tumorigénico más agresivo. Asimismo, la relevancia clínica de nuestros resultados determina que el análisis comparativo de los ARNms contenidos en los exosomas aislados de pacientes con cáncer de mama, revelan una firma de "pluripotencialidad y metástasis" altamente enriquecida en dichos mensajeros que proceden de pacientes con peor pronóstico. Esto contribuye a la identificación de una firma molecular pronóstica en cáncer de mama que podría trasladarse fácilmente a la práctica clínica, ya que estos biomarcadores se obtienen mediante un método no invasivo.

Aunque más estudios son necesarios, esta firma también podría ser utilizada durante el seguimiento de los pacientes para identificar cuales evolucionarán de una forma desfavorable. La búsqueda de nuevas terapias capaces de bloquear la liberación de los exosomas y su contenido, ofrecería un efecto sinérgico con las terapias actuales en dichos pacientes que por lo general presentan un peor resultado. De esta misma manera, las propiedades de *CXCR4* relacionadas con pluripotencialidad mostradas por las células tumorales con mayor capacidad metastásica podrían ser potencialmente explotadas según un enfoque terapéutico de las CSCs inhibiendo *CXCR4* (por ejemplo TN14003 o AMD3100), y evitar así los efectos oncogénicos de los exosomas. A pesar de lo prometedor de nuestros resultados, sería necesario la ampliación de estos estudios en series más largas e independientes.

En resumen, consideramos que con el presente trabajo hemos contribuido al conocimiento de algunos de los mecanismos por los que las células tumorales consiguen modificar aquellas funciones que favorecen su propia supervivencia y autonomía.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión ectópica de CXCR4 en las células que presentan baja capacidad de pluripotencialidad y son no invasivas, incrementa los marcadores relacionados con un fenotipo *stem* e inducen proliferación, migración e invasión, en modelos celulares de cáncer de mama *in vitro*.
2. La expresión de *CXCR4* ejerce un efecto sobre la capacidad tumorigénica de las células de carcinoma de mama en modelos *in vivo*.
3. La adición de exosomas derivados de células con mayor capacidad de pluripotencialidad (elevados niveles de CXCR4) afecta de manera paracrina a células receptoras con baja capacidad de pluripotencialidad, produciendo un aumento de la proliferación, de la migración y de la invasión, así como un incremento de la expresión de genes asociados con pluripotencia, en modelos celulares de cáncer de mama *in vitro*.
4. Los exosomas que provienen de células que sobreexpresan CXCR4 participan activamente en el crecimiento del tumor primario y en el desarrollo del potencial metastásico, en modelos celulares de cáncer de mama *in vivo*.
5. Los exosomas derivados de células que sobreexpresan CXCR4 están altamente enriquecidos en ARNms relacionados con pluripotencialidad y metástasis.
6. Los exosomas derivados de células que sobreexpresan CXCR4 tienen un papel oncogénico, apoyando su implicación en los procesos de crecimiento, invasión local y diseminación tumoral.
7. Los exosomas aislados de pacientes diagnosticados con cáncer de mama presentan diversos ARNms asociados con pluripotencia y metástasis. Los elevados niveles de los ARNms seleccionados contenidos en exosomas se asocian con supervivencias más cortas de los pacientes. Además, se correlacionan con las características clínico-patológicas indicativas de un pronóstico más desfavorable.

8. La definición de una firma génica relacionada con pluripotencialidad y metástasis se asocia con una peor evolución de la enfermedad de una manera mupacientes con receptores hormonales positivos y HER2 negativo esta firma también es indicativa de un peor pronóstico.
9. La relevancia clínica de estos resultados es poder establecer en los exosomas una firma génica relacionada con pluripotencialidad y metástasis, la cual presenta un claro valor informativo sobre la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama.
10. La identificación de esta firma de expresión génica relacionada con pluripotencialidad y metástasis contenida en los exosomas es potencialmente aplicable en la clínica y fácilmente trasladable a ella, ya que los marcadores utilizados son obtenidos mediante un método no invasivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol* 2016; 36: 301–312.
- Ablett MP, O'Brien CS, Sims AH, Farnie G, Clarke RB. A differential role for CXCR4 in the regulation of normal versus malignant breast stem cell activity. *Oncotarget* 2014; 5: 599–612.
- Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, Gripenbäck S, Tornling G, Eklund A *et al.* Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J* 2003; 22: 578–583.
- Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filén J-J, Lahesmaa R, Norman M *et al.* Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 2007; 179: 1969–1978.
- Adorno-Cruz V, Kibria G, Liu X, Doherty M, Junk DJ, Guan D *et al.* Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance. *Cancer Res* 2015; 75: 924–929.
- Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2009; 11: R46.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983–3988.
- Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A *et al.* Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 619–624.
- Andre F, Scharztz NEC, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P *et al.* Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 2002; 360: 295–305.

- Antonyak MA, Cerione RA. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer. *Methods Mol Biol* 2014; 1165: 147–173.
- Armstrong AJ. Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Clin Adv Hematol Oncol* 2011; 9: 941–943.
- Asea A, Jean-Pierre C, Kaur P, Rao P, Linhares IM, Skupski D *et al.* Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol* 2008; 79: 12–17.
- Atay S, Godwin AK. Tumor-derived exosomes: A message delivery system for tumor progression. *Commun Integr Biol* 2014; 7: e28231.
- Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev* 2013; 32: 623–642.
- Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 677–685.
- Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 511–518.
- Batista BS, Eng WS, Pilobello KT, Hendricks-Muñoz KD, Mahal LK. Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J Proteome Res* 2011; 10: 4624–4633.
- Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J *et al.* The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 84–89.
- Benito-Martin A, Di Giannatale A, Ceder S, Peinado H. The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression. *Front Immunol* 2015; 6: 66.
- Benovic JL, Marchese A. A new key in breast cancer metastasis. *Cancer Cell* 2004; 6: 429–430.

- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J *et al.* The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382: 829–833.
- Boimel PJ, Smirnova T, Zhou ZN, Wyckoff J, Park H, Coniglio SJ *et al.* Contribution of CXCL12 secretion to invasion of breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2012; 14: R23.
- Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A *et al.* Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs (Print)* 2005; 179: 56–65.
- Bretz NP, Ridinger J, Rupp A-K, Rimbach K, Keller S, Rupp C *et al.* Body fluid exosomes promote secretion of inflammatory cytokines in monocytic cells via Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2013; 288: 36691–36702.
- Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. *Leukemia* 2009; 23: 43–52.
- Caby M-P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 2005; 17: 879–887.
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 76–83.
- Chaput N, Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 419–440.
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P *et al.* Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 2009; 69: 1302–1313.

Chatterjee SK, Kim U. Galactosyltransferase activity in metastasizing and nonmetastasizing rat mammary carcinomas and its possible relationship with tumor cell surface antigen shedding. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 273–280.

Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 2008; 359: 2814–2823.

Chiasserini D, van Weering JRT, Piersma SR, Pham TV, Malekzadeh A, Teunissen CE *et al.* Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: a comprehensive dataset. *J Proteomics* 2014; 106: 191–204.

Clarke MF. Oncogenes, self-renewal and cancer. *Pathol Biol* 2006; 54: 109–111.

Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011; 17: 313–319.

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 43–51.

Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD, Dubrovskaya A. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 1347–1361.

Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255–289.

Comen E, Norton L, Massagué J. Clinical implications of cancer self-seeding. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 369–377.

Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Gonzalez E, Berisa A, Gil D, Embade N *et al.* Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. *Proteomics Clin Appl* 2010; 4: 416–425.

Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* 2015; 17: 816–826.

- Crocker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 374–390.
- Darini CY, Pisani DF, Hofman P, Pedetour F, Sudaka I, Chomienne C *et al.* Self-renewal gene tracking to identify tumour-initiating cells associated with metastatic potential. *Oncogene* 2012; 31: 2438–2449.
- De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, Roels F. Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. *Clin Chim Acta* 1977; 81: 237–245.
- Dick JE, Lapidot T. Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells. *Int J Hematol* 2005; 82: 389–396.
- Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, Köprunner M, Dörries J, Meyer D *et al.* Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 2002; 111: 647–659.
- Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EGE *et al.* A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer* 2013; 49: 219–230.
- Dubrovskaya A, Elliott J, Salamone RJ, Teleguev GD, Stakhovsky AE, Schepotin IB *et al.* CXCR4 expression in prostate cancer progenitor cells. *PLoS ONE* 2012; 7: e31226.
- Dutta S, Reamtong O, Pangvongsa W, Kitdumrongthum S, Janpipatkul K, Sangvanich P *et al.* Proteomics profiling of cholangiocarcinoma exosomes: A potential role of oncogenic protein transferring in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2015. doi:10.1016/j.bbdis.2015.06.024.
- EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 347–357.
- Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008; 15: 504–514.

Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B *et al.* Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 2006; 31: 642–648.

Fernández-Periáñez R, Molina-Privado I, Rojo F, Guijarro-Muñoz I, Alonso-Camino V, Zazo S *et al.* Basement membrane-rich organoids with functional human blood vessels are permissive niches for human breast cancer metastasis. *PLoS ONE* 2013; 8: e72957.

Ferraro PT, Behren A, Anderson RL, Thompson EW. Editorial: Cellular and Phenotypic Plasticity in Cancer. *Front Oncol* 2015; 5: 171.

Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9683–9688.

Floor S, van Staveren WCG, Larsimont D, Dumont JE, Maenhaut C. Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene* 2011; 30: 4609–4621.

Floor S, van Staveren WCG, Larsimont D, Dumont JE, Maenhaut C. Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene* 2011; 30: 4609–4621.

Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, Rhim JS. CXCR4 and cancer. *Pathol Int* 2010; 60: 497–505.

Fusi A, Liu Z, Kümmerlen V, Nonnemacher A, Jeske J, Keilholz U. Expression of chemokine receptors on circulating tumor cells in patients with solid tumors. *J Transl Med* 2012; 10: 52.

García JM, García V, Peña C, Domínguez G, Silva J, Diaz R *et al.* Extracellular plasma RNA from colon cancer patients is confined in a vesicle-like structure and is mRNA-enriched. *RNA* 2008; 14: 1424–1432.

Gassenmaier M, Chen D, Buchner A, Henkel L, Schiemann M, Mack B *et al.* CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells* 2013; 31: 1467–1476.

- Gassmann P, Haier J, Schlüter K, Domikowsky B, Wendel C, Wiesner U *et al.* CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo. *Neoplasia* 2009; 11: 651–661.
- Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier H *et al.* The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 807–817.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555–567.
- Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2013; 2. doi:10.3402/jev.v2i0.20389.
- Griffiths GS, Galileo DS, Reese K, Martin-Deleon PA. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 1627–1636.
- Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 1036–1045.
- Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127: 679–695.
- György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 2667–2688.
- György B, Szabó TG, Turiák L, Wright M, Herczeg P, Lédeczi Z *et al.* Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS ONE* 2012; 7: e49726.
- Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983; 97: 329–339.

Hata T, Murakami K, Nakatani H, Yamamoto Y, Matsuda T, Aoki N. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 528–533.

Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem* 2015; 61: 112–123.

Herrera A, Herrera M, Peña C. The emerging role of Snail1 in the tumor stroma. *Clin Transl Oncol* 2015. doi:10.1007/s12094-015-1474-9.

Herrera A, Herrera M, Alba-Castellón L, Silva J, García V, Loubat-Casanovas J *et al.* Protumorigenic effects of Snail-expression fibroblasts on colon cancer cells. *Int J Cancer* 2014; 134: 2984–2990.

Herrera M, Islam ABMMK, Herrera A, Martín P, García V, Silva J *et al.* Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5914–5926.

Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer. *Front Genet* 2013; 4: 36.

Hindriksen S, Bijlsma MF. Cancer Stem Cells, EMT, and Developmental Pathway Activation in Pancreatic Tumors. *Cancers (Basel)* 2012; 4: 989–1035.

Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 2011; 13: 215.

Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 2011; 71: 3792–3801.

Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; 527: 329–335.

<http://www.atcc.org>

<http://www.cancer.gov>

<http://www.exocarta.org>

<http://www.seom.org>

Hwang-Verslues WW, Kuo W-H, Chang P-H, Pan C-C, Wang H-H, Tsai S-T *et al.* Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS ONE* 2009; 4: e8377.

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 1987; 262: 9412–9420.

Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle* 2011; 10: 2865–2873.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420–1428.

Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest* 2016; 126: 1208–1215.

Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest* 2016; 126: 1208–1215.

Kang C-S, Ban M, Choi E-J, Moon H-G, Jeon J-S, Kim D-K *et al.* Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially *Akkermansia muciniphila*, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis. *PLoS ONE* 2013; 8: e76520.

Kim D-K, Lee J, Kim SR, Choi D-S, Yoon YJ, Kim JH *et al.* EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics* 2015; 31: 933–939.

Koga Y, Yasunaga M, Moriya Y, Akasu T, Fujita S, Yamamoto S *et al.* Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol* 2011; 2: 215–222.

- Kortesidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, Lapidot T, Gronthos S. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 2005; 105: 3793–3801.
- Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2007; 292: C987–995.
- Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 83: 249–289.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 178–196.
- Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A *et al.* Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 2011; 9: 9.
- Lässer C, O’Neil SE, Ekerljung L, Ekström K, Sjöstrand M, Lötval J. RNA-containing exosomes in human nasal secretions. *Am J Rhinol Allergy* 2011; 25: 89–93.
- Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJA. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet* 2012; 21: R125–134.
- Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res* 2007; 17: 3–14.
- Li YM, Pan Y, Wei Y, Cheng X, Zhou BP, Tan M *et al.* Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 2004; 6: 459–469.
- Liao W-T, Ye Y-P, Deng Y-J, Bian X-W, Ding Y-Q. Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics. *Am J Stem Cells* 2014; 3: 46–62.
- Liotta LA. An attractive force in metastasis. *Nature* 2001; 410: 24–25.
- Liu S, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4006–4012.

- Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 35: 69–77.
- Lorico A, Rappa G. Phenotypic heterogeneity of breast cancer stem cells. *J Oncol* 2011; 2011: 135039.
- Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 2014; 3: 26913.
- Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704–715.
- Mannello F. Understanding breast cancer stem cell heterogeneity: time to move on to a new research paradigm. *BMC Med* 2013; 11: 169.
- Marotta LLC, Polyak K. Cancer stem cells: a model in the making. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19: 44–50.
- Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 23–38.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010; 73: 1907–1920.
- Mego M, Cholujo D, Minarik G, Sedlackova T, Gronesova P, Karaba M *et al.* CXCR4-SDF-1 interaction potentially mediates trafficking of circulating tumor cells in primary breast cancer. *BMC Cancer* 2016; 16: 127.
- Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015; 523: 177–182.

- Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A *et al.* Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 2014; 26: 707–721.
- Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release* 2015. doi:10.1016/j.jconrel.2015.06.029.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005; 436: 518–524.
- Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 328–335.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50–56.
- Munson P, Shukla A. Exosomes: Potential in Cancer Diagnosis and Therapy. *Medicines (Basel)* 2015; 2: 310–327.
- Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL *et al.* Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS ONE* 2013; 8: e58502.
- Nolte-'t Hoen ENM, Buermans HPJ, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MHM, 't Hoen PAC. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 9272–9285.
- O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin Radiat Oncol* 2009; 19: 71–77.
- Ogawa Y, Miura Y, Harazono A, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H *et al.* Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull* 2011; 34: 13–23.

- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121: 335–348.
- Øverbye A, Skotland T, Koehler CJ, Thiede B, Seierstad T, Berge V *et al.* Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget* 2015; 6: 30357–30376.
- Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 1985; 101: 942–948.
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012; 18: 883–891.
- Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* 2011; 21: 139–146.
- Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36: 888–906.
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996; 183: 1161–1172.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200: 373–383.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105–111.
- Rhodes LV, Short SP, Neel NF, Salvo VA, Zhu Y, Elliott S *et al.* Cytokine receptor CXCR4 mediates estrogen-independent tumorigenesis, metastasis, and resistance to endocrine therapy in human breast cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 603–613.

- Rodríguez M, Silva J, Herrera A, Herrera M, Peña C, Martín P *et al.* Exosomes enriched in stemness/metastatic-related mRNAs promote oncogenic potential in breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6: 40575–40587.
- Rodríguez M, Silva J, López-Alfonso A, López-Muñiz MB, Peña C, Domínguez G *et al.* Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2014; 53: 713–724.
- Roma-Rodrigues C, Fernandes AR, Baptista PV. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 179486.
- Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 2009; 324: 1670–1673.
- Schimanski CC, Galle PR, Moehler M. Chemokine receptor CXCR4-prognostic factor for gastrointestinal tumors. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4721–4724.
- Shekhani MT, Jayanthi A-S, Maddodi N, Setaluri V. Cancer stem cells and tumor transdifferentiation: implications for novel therapeutic strategies. *Am J Stem Cells* 2013; 2: 52–61.
- Shifrin DA, Demory Beckler M, Coffey RJ, Tyska MJ. Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. *Mol Biol Cell* 2013; 24: 1253–1259.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63: 11–30.
- Silva J, Garcia V, Rodriguez M, Compte M, Cisneros E, Vaguillas P *et al.* Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 409–418.
- Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 575–581.

- Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics* 2009; 6: 267–283.
- Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010; 29: 4741–4751.
- Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1470–1476.
- Skriner K, Adolph K, Jungblut PR, Burmester GR. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3809–3814.
- Soldevilla B, Rodríguez M, San Millán C, García V, Fernández-Periañez R, Gil-Calderón B *et al.* Tumor-derived exosomes are enriched in Δ Np73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 467–478.
- Takebe N, Ivy SP. Controversies in cancer stem cells: targeting embryonic signaling pathways. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3106–3112.
- Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2927–2931.
- Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B *et al.* Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 2014; 24: 766–769.
- Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J *et al.* Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 2001; 166: 7309–7318.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3: Unit 3.22.

- Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 581–593.
- Tokuhisa M, Ichikawa Y, Kosaka N, Ochiya T, Yashiro M, Hirakawa K *et al.* Exosomal miRNAs from Peritoneum Lavage Fluid as Potential Prognostic Biomarkers of Peritoneal Metastasis in Gastric Cancer. *PLoS ONE* 2015; 10: e0130472.
- Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1981; 645: 63–70.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654–659.
- Van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N *et al.* Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 2001; 121: 337–349.
- Vojtech L, Woo S, Hughes S, Levy C, Ballweber L, Sauteraud RP *et al.* Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 7290–7304.
- Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 411–425.
- Wicha MS. Breast cancer stem cells: the other side of the story. *Stem Cell Rev* 2007; 3: 110–112; discussion 113.
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C *et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001; 7: 297–303.
- Wu K-J, Yang M-H. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness: the Twist1-Bmi1 connection. *Biosci Rep* 2011; 31: 449–455.

- Wysoczynski M, Reza R, Ratajczak J, Kucia M, Shirvaikar N, Honczarenko M *et al.* Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 2005; 105: 40–48.
- Xu C, Zhao H, Chen H, Yao Q. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 4953–4964.
- Xu T-P, Shen H, Liu L-X, Shu Y-Q. The impact of chemokine receptor CXCR4 on breast cancer prognosis: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 2013; 37: 725–731.
- Yagi H, Tan W, Dillenburg-Pilla P, Armando S, Amornphimoltham P, Simaan M *et al.* A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* 2011; 4: ra60.
- Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015; 4: 27066.
- Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev* 2013; 27: 31–39.
- Zhang H-G, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 959–964.
- Zhang Y, Wang X-F. A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nat Cell Biol* 2015; 17: 709–711.
- Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998; 4: 594–600.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121–127.

Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 597–606.

Zomer A, Maynard C, Verweij FJ, Kamermans A, Schäfer R, Beerling E *et al.* In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell* 2015; 161: 1046–1057.

Zomer A, van Rheenen J. Implications of Extracellular Vesicle Transfer on Cellular Heterogeneity in Cancer: What Are the Potential Clinical Ramifications? *Cancer Res* 2016; 76: 2071–2075.

ANEXO I

El trabajo desarrollado en este período de investigación ha generado una serie de resultados que han sido recogidos en publicaciones cuyas referencias aparecen aquí indicadas:

PUBLICACIÓN PRINCIPAL DE LA TESIS DOCTORAL:

- **Rodríguez M**, Silva J, Herrera A, Herrera M, Peña C, Martín P, Gil-Calderón B, Larriba MJ, Coronado MJ, Soldevilla B, Turrión VS, Provencio M, Sánchez A, Bonilla F†, García V†. *Exosomes enriched in stemness/metastatic-related mRNAs promote oncogenic potential in breast cancer. Specific prognostic exosome signature*. Oncotarget. 2015 Dic 1; 6(38):40575-40587.

PUBLICACIONES MUY ESTRECHAMENTE RELACIONADAS CON EL TEMA DE LA TESIS DOCTORAL:

- **Rodríguez M***, Silva J*, López-Alfonso A, López-Muñiz MB, Peña C, Domínguez G, García JM, López-García A, Méndez M, Provencio M, García V†, Bonilla F†. *Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer*. Genes Chromosomes Cancer. 2014 Sep; 53(9):713-724.
- Soldevilla B*, **Rodríguez M***, San Millán C, García V, Fernández-Periañez R, Gil-Calderón B, Martín P, García-Grande A, Silva J, Bonilla F†, Domínguez G†. *Tumor-derived exosomes are enriched in $\Delta Np73$, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival*. Hum Mol Genet. 2014 Ene 15; 23(2):467-478.
- Silva J, García V, **Rodríguez M**, Compte M, Cisneros E, Veguillas P, García JM, Domínguez G, Campos-Martin Y, Cuevas J, Peña C, Herrera M, Díaz R, Mohammed N, Bonilla F. *Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer*. Genes Chromosomes Cancer. 2012 Abr; 51(4):409-418.

OTRAS PUBLICACIONES DURANTE ESTE PERÍODO DE FORMACIÓN:

- Soldevilla B, Díaz R, Silva J, Muñoz C, García V, García JM, Peña C, Herrera M, **Rodríguez M**, Gómez I, Mohamed N, Bonilla F, Domínguez G. *Prognostic impact of $\Delta TAp73$*

isoform levels and their target genes in colon cancer patients. Clin Cancer Res. 2011 Sep 15; 17(18):6029-6039.

- Mohamed N, Rodríguez M, García V, García JM, Domínguez G, Peña C, Herrera M, Gómez I, Díaz R, Soldevilla B, Herrera A, Silva J, Bonilla F. *EPAS1 mRNA in plasma from colorectal cancer patients is associated with poor outcome in advance stages.* Oncol Lett. 2011 Jul; 2(4):719-724.

ANEXO II

Exosomes enriched in stemness/metastatic-related mRNAs promote oncogenic potential in breast cancer

Marta Rodríguez¹, Javier Silva¹, Alberto Herrera², Mercedes Herrera², Cristina Peña², Paloma Martín³, Beatriz Gil-Calderón², María Jesús Larriba⁴, M^a José Coronado⁵, Beatriz Soldevilla^{6,7}, Víctor S. Turrión⁸, Mariano Provencio⁹, Antonio Sánchez⁹, Félix Bonilla¹⁰, Vanesa García-Barberán^{1,11}

¹"Mecanismos Moleculares Tumorales" Research Group, Department of Medical Oncology, IDIPHIM, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Madrid, E-28222, Spain

²"Señalización Celular en Cáncer" Research Group, Department of Medical Oncology, IDIPHIM, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Madrid, E-28222, Spain

³Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathology, IDIPHIM, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Madrid, E-28222, Spain

⁴Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Department of Cancer Biology, CSIC-UAM, Madrid, E-28029, Spain

⁵Confocal Microscopy Core Facility, IDIPHIM, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Madrid, E-28222, Spain

⁶Department of Molecular Biology, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras CIBERER-ISCIII, Madrid, E-28049, Spain

⁷"Diagnóstico y pronóstico molecular en cáncer" Research Group, Department of Medical Oncology, IDIPHIM, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Madrid, E-28222, Spain

⁸Department of Digestive and General Surgery, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid, E-28222, Spain

⁹Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid, E-28222, Spain

¹⁰Centro de Estudios Biosanitarios, Madrid, E-28029, Spain

¹¹Molecular Oncology Laboratory, Department of Medical Oncology, IDISSC, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos, Madrid, E-28040, Spain

Correspondence to:

Félix Bonilla, **e-mail:** felixbonillavelasco@gmail.com

Vanesa García-Barberán, **e-mail:** vanesa.garciabar@salud.madrid.org

Keywords: exosomes, liquid biopsy, breast cancer, mRNA, stemness and metastasis

Received: April 22, 2015

Accepted: October 16, 2015

Published: October 26, 2015

ABSTRACT

Cancer cells efficiently transfer exosome contents (essentially mRNAs and microRNAs) to other cell types, modifying immune responses, cell growth, angiogenesis and metastasis. Here we analyzed the exosomes release by breast tumor cells with different capacities of stemness/metastasis based on CXCR4 expression, and evaluated their capacity to generate oncogenic features in recipient cells. Breast cancer cells overexpressing CXCR4 showed an increase in stemness-related markers, and in proliferation, migration and invasion capacities. Furthermore, recipient cells treated with exosomes from CXCR4-cells showed increased in the same abilities. Moreover, inoculation of CXCR4-cell-derived exosomes in immunocompromised mice stimulated primary tumor growth and metastatic potential. Comparison of nucleic acids contained into exosomes isolated from patients revealed a "stemness and metastatic" signature in exosomes of patients with worse prognosis. Finally, our data supported the view that cancer cells with stem-like properties show concomitant metastatic behavior, and their exosomes stimulate tumor progression and metastasis. Exosomes-derived nucleic acids from plasma of breast cancer patients are suitable markers in the prognosis of such patients.

INTRODUCTION

Exosomes are a type of nanovesicles that differ from other extracellular vesicles in their endocytic origin, their size (40–100 nm) and their specific molecular cargo. Exosomes released from cells, including tumor cells, provide a significant mechanism of intercellular communication. Previous studies in cancer cells have shown that these released nanovesicles transfer their content to other cell types, modifying immune responses, cell growth, angiogenesis and metastasis [1, 2].

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women [3], and metastasis is responsible for morbidity and the majority of cancer-related death. Metastasis is a multi-step evolutionary process in which cancer cells acquire alterations allowing them to transcend their programmed behavior to disseminate from the primary tumor, intravasate into the blood circulation and eventually extravasate into foreign tissues. Ultimately, a few of these cells (0.01–0.02%) will adapt to the new distal microenvironment and form macrometastases [4]. Moreover, only a subpopulation of cancer cells with stem-like properties is competent to initiate tumor growth and disseminate to distant organs [5, 6]. These cancer stem cells (CSC) are able to self-renew and generate the heterogeneous lineages of cancer cells that comprise the tumor. Furthermore, these cells have phenotypic plasticity and resist drug-induced DNA damage. Collectively, the capacity of these cells to evade destruction and survive at distal sites makes CSC more likely to support the establishment of primary tumors and to succeed in the later steps of metastasis. In addition, this property may explain why micrometastases can remain dormant after removal of the primary tumor and recur many years later [7, 8]. Thus, these CSCs are responsible for metastatic growth in breast cancer which contributes to majority of the breast cancer related morbidity and mortality.

Recently, many studies have shown that the presence of the chemokine receptor CXCR4 is involved in many stages of tumorigenesis, as invasion and metastasis in several cancers, including breast cancer [9]. The paracrine and endocrine effects through CXCL12/CXCR4 are critical for tumor growth, invasion, angiogenesis and metastasis [10]. This axis is also involved in cancer stem cell characteristics [11, 12], and is an important marker for metastatic potential of CSC [13]. Furthermore, increased CXCR4 is correlated with high risk for recurrence and poor overall survival in multiple cancer patients including breast, lung, kidney, colon, ovarian, and brain cancers, as well as lymphoma and leukemia.

There is therefore a need to better understand mechanisms associated with metastatic process in breast cancer. We used a model based on CXCR4-transfected culture to analyze the role of exosomes released from breast tumor cells with different stemness/metastasis

abilities in the capacities for tumor growth, generation of stem cell features in neighboring cells, and metastatic potential. Finally, exosomes from plasma of breast cancer patients were characterized and assessed their capacity as prognostic marker in liquid biopsy.

RESULTS

For this study, we used the expression of aldehyde dehydrogenase (ALDH) to identify cancer cells with stem cell features in three human breast cancer cell lines. Similarly, as described elsewhere [14], HCC38 cell line showed 100% of ALDH-positive cells, whereas MDA-MB-231 and T47D cell lines showed 1% and 0% of ALDH-positive cells respectively (Supplementary Figure S1A). Therefore, T47D cells showed absence of stem cell features, and previously, it has been broadly identified as non-invasive and non-metastatic, forming tumors only in the presence of oestrogen [15]. For these reasons, this cell line was selected to stably transfect CXCR4 gene (Supplementary Figure S1B) and to study the paracrine effect of its exosomes when CXCR4 is overexpressed. HCC38 and MDA-MB-231 cell lines were used as controls of stemness and metastatic capacities, respectively.

Before of analyse the potential effects of exosomes released by CXCR4-cells, we tested the effects of CXCR4 overexpression in the transfected breast cancer cell line. As expected, CXCR4 expression increases proliferation, migration and invasion capabilities *in vitro* (Supplementary Figure S2A–S2C). Moreover, contribution of CXCR4 to tumorigenic and metastatic capacities was observed in two *in vivo* models: using a tumorigenic/metastatic cell line (MDA-MB-231) and a non-tumorigenic cell line (T47D) (Supplementary Figure S2D–S2G). Moreover, CXCR4-cells showed increased expression of stemness-related markers (Supplementary Figure S3). Together, these results using *in vitro* and *in vivo* models indicate that expression of CXCR4 stimulates tumorigenic and metastatic capacities in breast cancer cells, confirming previously described data.

Exosomes released by CXCR4-cells increase, by a paracrine manner, stemness-related markers expression, proliferation, migration and invasion *in vitro* in breast cancer cells

Correct exosomes isolation were confirmed by transmission electron microscopy (Supplementary Figure S4A) and nanoparticle tracking analysis (Supplementary Figure S4B), which revealed vesicles within the expected size range (50–100 nm). Moreover, immunoblotting confirmed the presence of exosomal proteins CD63 and CD81 and the absence of negative control Calnexin (Supplementary Figure S4C). To analyze the uptake of exosomes by recipient cells, T47D-CXCR4 exosomes

were labelled with PKH67 dye and added them to cultures of T47D cells. Confocal microscopy confirmed the internalization of T47D-CXCR4 exosomes in T47D cells (Supplementary Figure S4D).

Expression of genes involved in stemness was quantified in T47D recipient cells after addition of T47D-CXCR4 exosomes. As the epithelial-mesenchymal transition (EMT) has been implicated in the generation of stem cell properties [16], expression of *SNAIL* and *CDH1* was also quantified. We found increased expression of

stemness- and EMT-related mRNAs in T47D cells after addition of T47D- and MDA-MB-231-CXCR4 exosomes (Figure 1A).

After addition of exosomes from T47D-CXCR4 cells, T47D cells exhibited higher proliferation capacity than T47D cells incubated with equal amount of exosomes from T47D mock cells. Similarly, T47D cells incubated with MDA-MB-231- and HCC38-exosomes showed increased proliferation with respect to control cells (Figure 1B). T47D cells incubated with exosomes from

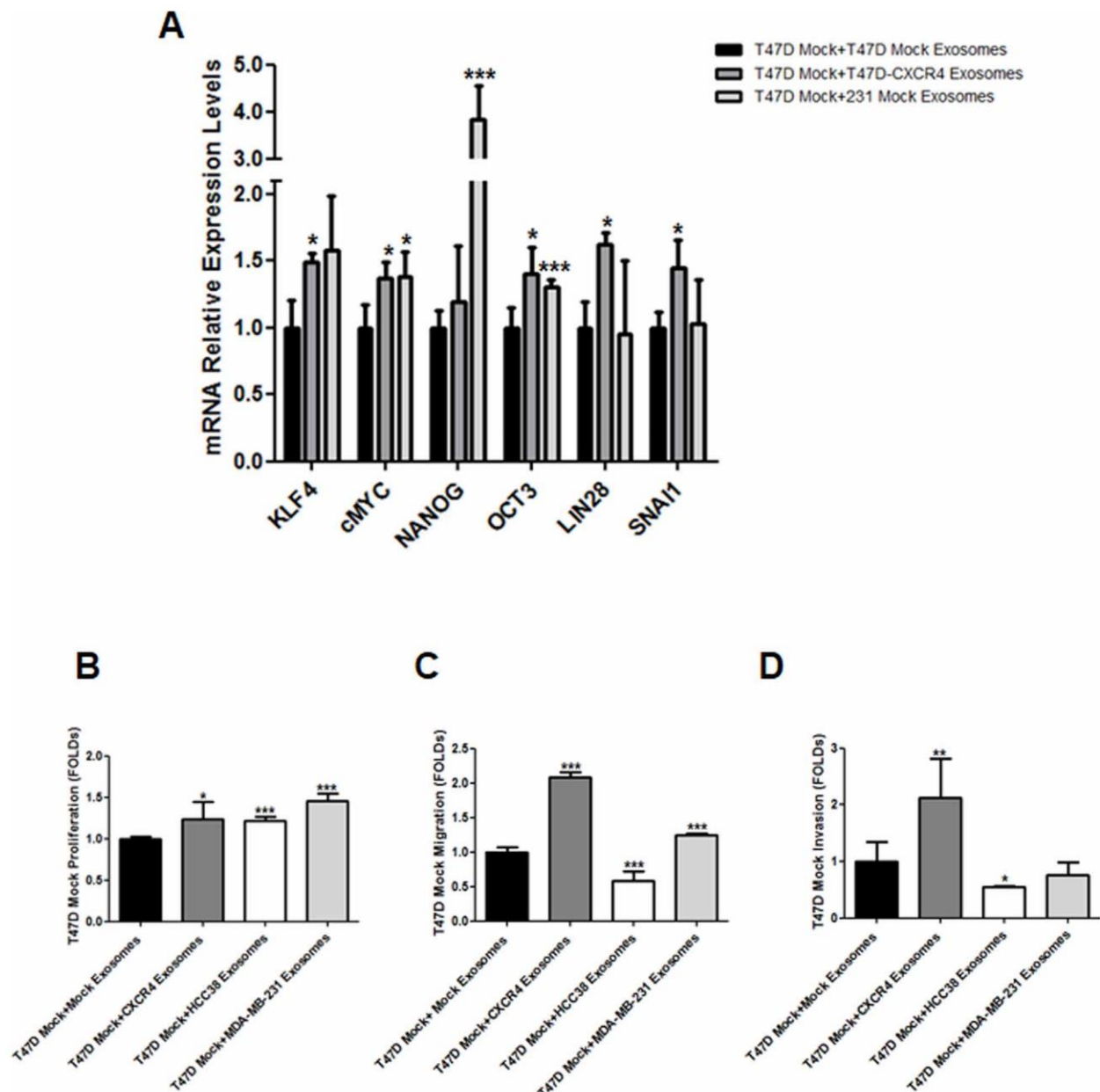


Figure 1: A. mRNA expression of stemness-related markers in recipient cells after addition of exosomes released by CXCR4-transfected cells. B. Proliferation assay, C. migration assay and D. invasion assay in recipient cells after addition of exosomes released by CXCR4-transfected cells, HCC38 and MDA-MB-231 cells. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; and *** $p \leq 0.005$.

T47D-CXCR4 and MDA-MB-231 showed increased migration potential with respect to T47D cells incubated with T47D-mock exosomes (Figure 1C). In contrast, T47D cells incubated with exosomes from HCC38 cells showed lower migration capacity. Similarly, T47D cells incubated with exosomes from T47D-CXCR4 showed increased invasion with respect to cells incubated with T47D-mock exosomes. T47D cells incubated with exosomes from HCC38 cells showed lower invasion capacity (Figure 1D).

These results indicate that exosomes derived from CXCR4-tumor cells modify stemness markers, proliferation, migration and invasion features of neighbouring cells.

Exosomes released by CXCR4-cells increase the oncogenic potential of tumor cells in mice

Next, roles of CXCR4-cells-derived exosomes in primary tumor growth and metastatic capacity were examined in two animal models: a tumorigenic/metastatic model using MDA-MB-231 cell line, and a non-tumorigenic model using T47D cell line.

In the first model, ten mice were treated with MDA-MB-231-CXCR4- or mock-exosomes intravenously injected, starting one day after orthotopic injection of MDA-MB-231^{FLuc} cells. Cells with firefly luciferase (F^{Luc}) reporter gene were used to improve the evaluation of metastasis. In mice injected with MDA-MB-231-CXCR4 exosomes, primary tumors showed enhanced tumor growth (Figure 2A), high percentage of Ki67 positive cells (Figure 2B) and increased levels of stemness/EMT-related mRNAs (Figure 2C). In addition, more metastasis was detected by *ex vivo* Bioluminescent Imaging (BLI) in mice treated with CXCR4-exosomes (Figure 3A): lymph nodes (ten mice), lung (three mice) and brain (one mouse) (Figure 3B). With mock-exosomes treatment, metastasis was only detected in lymph nodes of nine mice. Metastatic lesions were confirmed by immunohistochemistry using haematoxylin and eosin stain (Figure 3C).

Other mouse model was performed based on non-tumorigenic/metastatic cell line (T47D). Interestingly, mice treated with T47D-CXCR4 exosomes showed lymph node micrometastasis (Supplementary Figure S5).

These data indicate that exosome cargo from CXCR4-cells enhance tumor growth and metastatic potential in breast cancer models.

Exosomes released by T47D-CXCR4 are enriched in mRNAs related with stemness and metastasis

Trying to identify the possible mediators involved in the cross-talk between different cells through exosomes, the genetic information contained in exosomes released by T47D-CXCR4 cells was analyzed by PCR arrays. Thus, PCR arrays with most representative mRNAs involved in

metastasis and stem cell differentiation and development were performed in T47D-CXCR4 exosomes *versus* T47D-mock exosomes and HCC38 exosomes. T47D-CXCR4 exosomes were highly enriched in genes related with stem cell differentiation and development. Similarly, exosomes isolated from HCC38 cells (100% ALDH-positive) were highly enriched in these types of mRNA (Supplementary Figure S6). Thus, CXCR4 expression is involved in exosomes-gene expression profile changes related to biological process enrichment found in tumor cells with high stemness potential. The top ten enriched mRNAs carried in exosomes are shown in Supplementary Table S1.

Stemness and metastasis-related mRNAs contained in exosomes from plasma patients with breast cancer are associated with poor prognosis

In the same way, mRNAs related with stemness and metastasis were compared in pools of exosomes from plasma of patients by PCR array analysis. Patients were divided in two pools in base of their outcome: "Good outcome" and "Poor outcome" pool. Good outcome pool included patients without first relapse and death, and large follow-up (median follow-up of 119 months). Poor outcome pool included patients with first relapse and death, and short survival (median follow-up of 17 months). Levels of 8 metastasis-related mRNAs and 27 stemness-related mRNAs were higher in exosomes from patients with poor prognosis than in exosomes from patients with good prognosis. Supplementary Figure S6 shows the number of mRNAs with high levels detected in T47D-CXCR4 and HCC38 cells, and in the pool of patients with poor prognosis. mRNAs with highest levels detected in exosomes of poor prognosis pool (*NANOG*, *NEUROD1*, *HTR7*, *KISS1R*, *HOXC6*) were also increased in exosomes released by T47D-CXCR4 and HCC38 (Supplementary Table S1). These mRNAs were analyzed by real-time PCR in a large series of plasma from 173 breast cancer patients.

The patient series was followed for a mean of 73 months (range: 1–136). Individual survival analysis of each selected mRNA showed associations between high mRNA levels and patients DFS or OS (Figure 4 and Supplementary Table S2A). When levels of mRNA in exosomes from plasma were stratified for hormone receptors and HER2, associations were found between poor outcome in patients and high mRNA levels in exosomes in hormone-positive receptors and HER2-negative subgroups (Supplementary Figure S7 and Supplementary Table S2B–S2C). Moreover, high *NANOG* mRNA levels were associated with short DFS in the HER2-positive subgroup.

To study the possible additive effect of the selected mRNAs as a "stemness and metastatic signature", the patients were grouped according to the number of

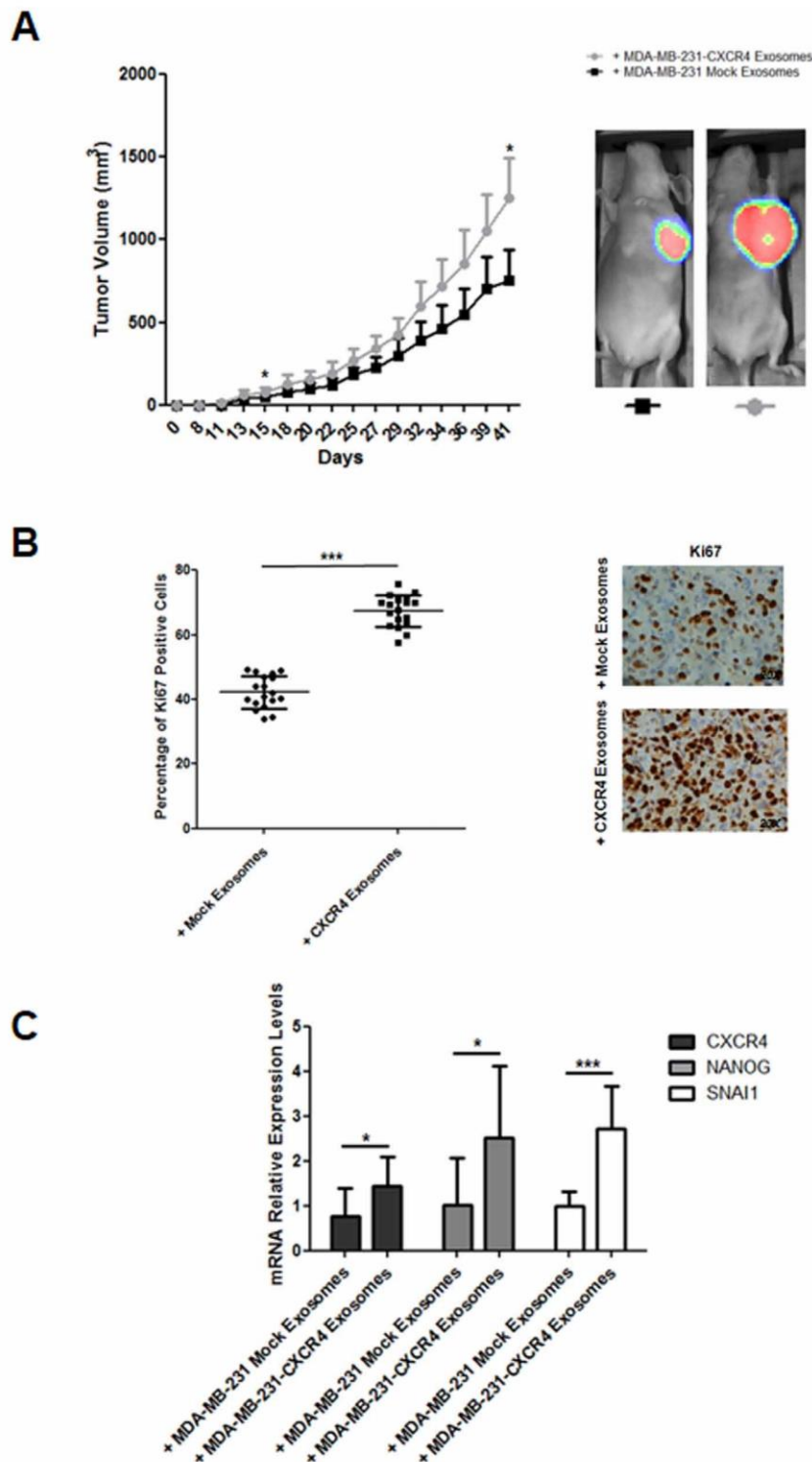


Figure 2: **A.** Evolution of tumor growth in immunodeficient mice intravenously injected with MDA-MB-231-CXCR4-derived exosomes. *In vivo* ventral coelenterazine-based FLuc-BLI images of a representative mouse ($*p \leq 0.05$). **B.** Ki67 immunohistochemistry of primary tumors developed in immunodeficient mice intravenously injected with MDA-MB-231-CXCR4-derived exosomes ($***p \leq 0.005$). **C.** CXCR4, NANOG and SNAI1 mRNA levels in primary tumors developed in immunodeficient mice intravenously injected with MDA-MB-231-CXCR4-derived exosomes as compared with tumors in mice treated with MDA-MB-231-mock-derived exosomes ($*p \leq 0.05$; and $***p \leq 0.005$).

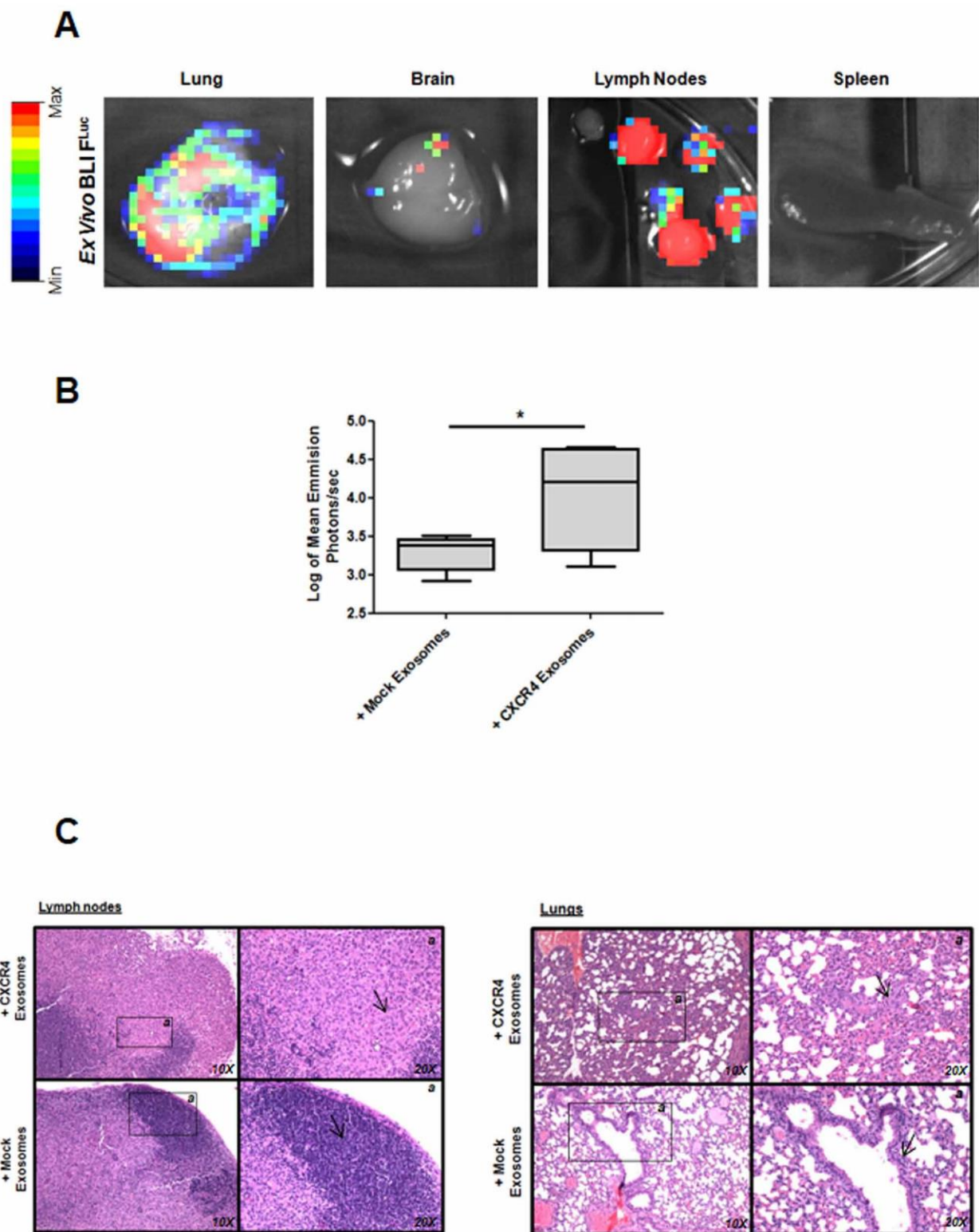


Figure 3: Metastasis after fat pad injection of MDA-MB-231^{FLuc} cells in mice treated with exosomes. A. *Ex vivo* D-luciferin-based FLuc-BLI images of excised lung, brain, lymph nodes and spleen of a representative mouse. **B.** Quantification of total photon flux in lymph nodes (* $p \leq 0.05$). **C.** Hematoxylin and eosin-stained sections taken from different part of lymph nodes and lungs (10X and 20X images are shown).

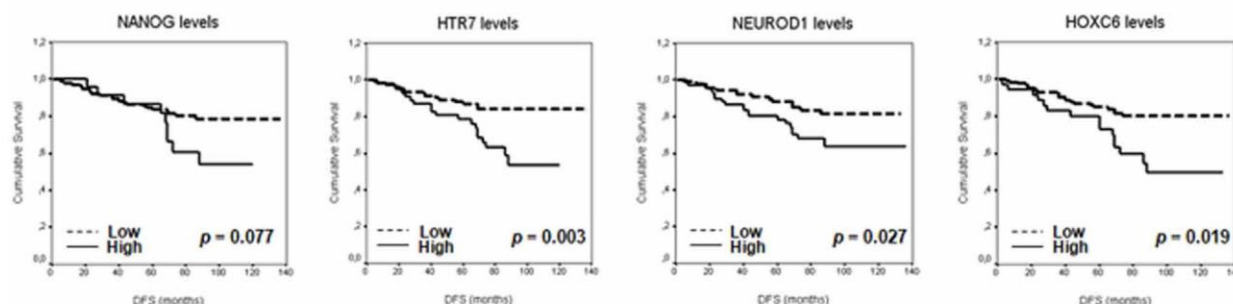
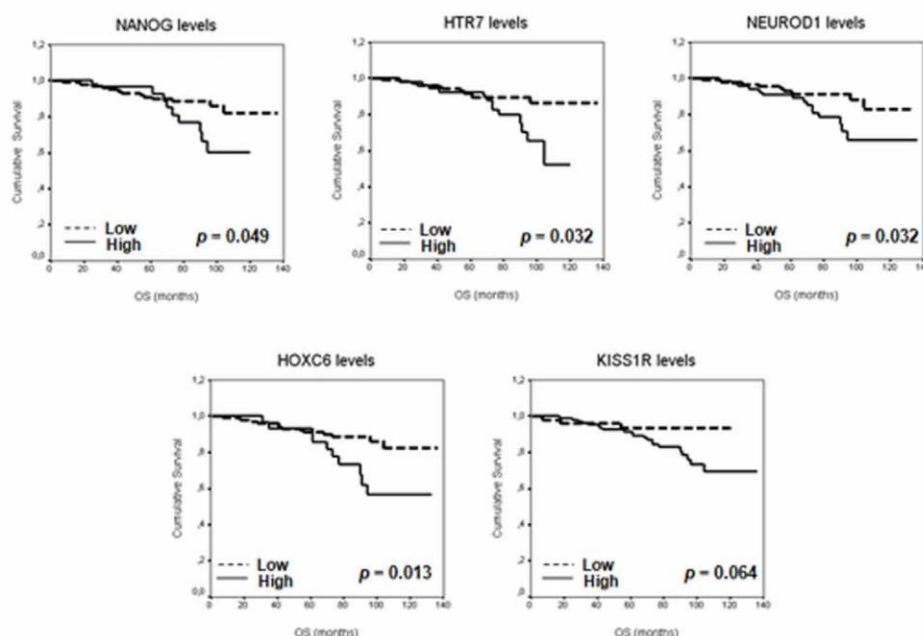
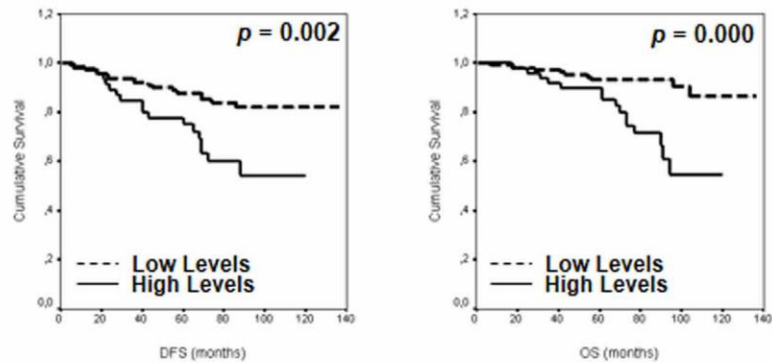
AmRNA exosome levels from total series patients**B**mRNA exosome levels from total series patients

Figure 4: **A.** Kaplan-Meier DFS curves in relation to levels of validated mRNA in exosomes from total series patients. **B.** Kaplan-Meier OS curves in relation to levels of validated mRNA in exosomes from total series patients.

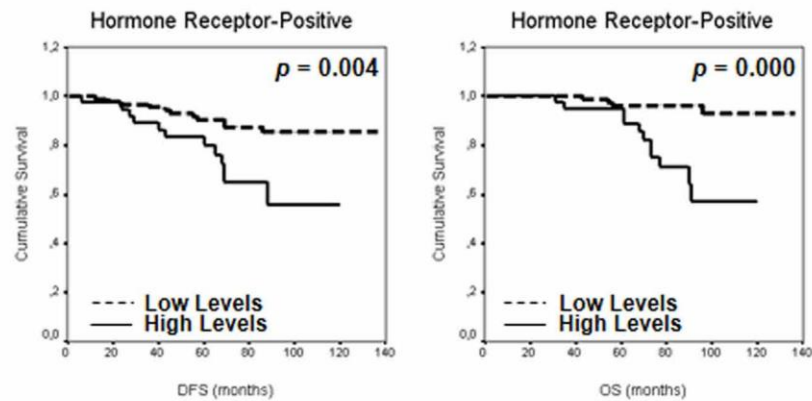
mRNA with high levels in plasma exosomes. Thus, patients were first classified on the basis of high levels of zero, one, two, three, four or five mRNAs. A clear association was observed between increased exosome-derived nucleic acids and breast cancer patients DFS or OS ($P = 0.021$ and $P = 0.016$, respectively). Next, to dichotomize the analysis, and based on similar mathematical behavior, patients with high levels of zero, one or two mRNAs were grouped as “low-levels” and those with more than three mRNAs were grouped as “high-levels”. Interestingly, correlation between

DFS or OS previously observed was stronger (Figure 5A and Supplementary Table S3). Adjusted analysis showed that this “stemness and metastatic signature” in exosomes had an independent relationship with OS and a trend with DFS (Table 1). In hormone receptor-positive and HER2-negative breast cancers, high levels of this signature were significantly associated with shorter DFS and OS (Figure 5B–5C and Supplementary Table S3). Moreover, relationships were found between clinicopathological parameters and signature high levels in exosomes (Supplementary Table S4).

A “Stemness and metastatic signature” levels in exosomes from total series patients



B “Stemness and metastatic signature” levels in exosomes



C “Stemness and metastatic signature” levels in exosomes

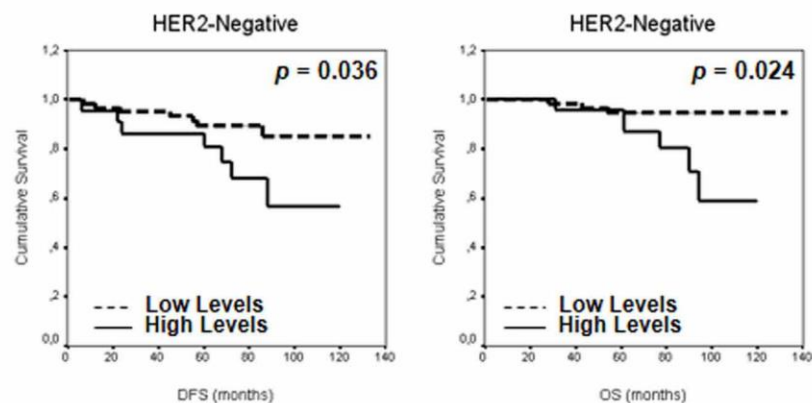


Figure 5: Kaplan-Meier DFS and OS curves in relation to “stemness and metastatic signature” levels in exosomes from **A.** total series patients, and patients classified on the basis of **B.** hormone receptors and **C.** HER2 status.

Table 1: Multivariate cox analysis of the association between “stemness and metastatic signature” and DFS and OS of breast cancer patients

	Variable	Category	Adjusted Analysis		P Value
			Hazard Ratio	95% CI	
DFS	PR	Positive vs Negative	0.28	0.11–0.74	0.010
	HER2	Positive vs Negative	3.53	1.2–10.2	0.020
	RT	progression vs complete	23.13	5.05–106.08	<0.001
	Signature level	High vs Low	2.68	0.95–7.53	0.062
OS	VLI	Yes vs No	5.52	2.03–15.04	0.001
	HR	Positive vs Negative	0.16	0.06–0.42	<0.001
	RT	progression vs complete	18.15	2.04–161.65	0.009
	Signature level	High vs Low	5.77	2.23–14.95	<0.001

VLI, vascular and lymphatic invasion; PR, progesterone receptor; HR, hormone receptors; RT: response to treatment.

Together, these results support the involvement of “stemness and metastatic” signature in exosome-derived nucleic acids in breast cancer patient survival.

DISCUSSION

In summary, this study demonstrates how exosomes derived from CXCR4-breast tumor cells modify stemness markers and enhance proliferation, migration and invasion abilities of neighboring cells. The *in vivo* significance of these findings is documented by the observation that inoculation of CXCR4-cells-derived exosomes in immunocompromised mice enhanced primary tumor growth and metastatic potential. Furthermore, clinical relevance is indicated by the observation that comparative analysis of mRNAs contained in exosomes isolated from patients revealed a gene signature of nucleic acids highly enriched in exosomes of patients with worse prognosis.

Exosomes influence most tumor-related pathways, such as proliferation, angiogenesis, EMT, promotion of immune escape, cancer stemness and metastasis involving many cell types within the tumor microenvironment [2, 17]. Regarding the stemness and the dissemination potential, cancer stem cell and metastatic cells share comparable behaviour and properties such as the capacity for self-renewal, the requirement for a specific microenvironment to grow and the SDF1/CXCR4 axis [18]. In line with the proposal that CSC shape the disseminating subpopulation of tumor cells, the positive correlation between EMT and CSC properties supports the theory of “migrating cancer stem cells” as the basis of metastasis colonization [19]. Numerous studies have reported that CSC also express EMT-related markers, and more crucially, that induction of EMT promotes the generation of CSC in transformed epithelial cells [18, 20]. Our study focused on these parallel characteristics in several culture models, based on the transfection of CXCR4, a

widely accepted chemokine receptor implicated in metastasis of breast cancer cells that also is overexpressed in breast cancer stem cells (CSC) [21, 22]. The main goal of the study is the contribution of exosomes released from CXCR4-breast tumor cells to tumor growth, dissemination capacity and generation of stem cell features after uptake by recipient cells.

In concordance with roles of CXCR4 described above, CXCR4-cells showed well known EMT-related features, elevated expression of several stem cell-related genes and surface markers, and higher proliferation rates, migration activity and cell invasiveness than mock cells. These results are in line with others studies performed in breast cancer cell lines transfected with CXCR4 [23]. Interestingly, our data indicate that this observation was supported by analysing the contribution of CXCR4-cell-derived exosomes to tumorigenic capacity in acceptor cells. Collectively, the *in vitro* set of developed experiments showed that CXCR4-cells-derived exosomes entailed an increase in stemness- and EMT-related markers and induced proliferation, migration and invasion capacities in non-pluripotent/non-invasive recipient cells.

CXCR4 overexpression promoted metastatic potential and oestrogen independence tumor growth *in vivo*, similarly to previous studies performed in MCF7 cells. Thus, tumor stem-like cells show metastatic behaviour [5, 6]. Accordingly, our *in vivo* experiments in immunocompromised mice inoculated with CXCR4-cell-derived exosomes established that exosomes increased primary tumor growth and metastatic potential. Together, these findings indicate that exosomes released by cancer cells with parallel stem-like and metastatic properties transfer these oncogenic features to recipient cells.

Our study identified a specific T47D-CXCR4-derived exosome signature highly enriched in nucleic acids related to both stem cell differentiation and metastasis. Interestingly, this signature was highly homologous to the content of exosomes

derived from HCC38, a cell line strongly positive for markers related with breast cancer stem cell subpopulations.

Moreover, by comparing the nucleic acids into exosomes from plasma of breast cancer patients divided by poor and good prognostic, several stemness and metastatic-related mRNAs in exosomes were identified, which were also increased in CXCR4-exosomes. Thus, we observed that levels of these mRNAs in exosomes are related to poor DFS and OS. When “stemness and metastatic” signature is taken into consideration, this relationship is more robust. Moreover, multivariate analysis clearly demonstrates that this variable is an independent prognostic marker for breast cancer patients. The selected exosome-derived nucleic acids have been implicated in growth and proliferation, induced pluripotent and embryonic stem cells, somatic stem cell maintenance, embryonic development, symmetry and segmentation, and in organ morphogenesis (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) v58.1). The clinical relevance of these findings is established by the definition of a “stemness and metastatic signature” in exosomes, which showed a remarkable prognostic value for the clinical outcome of breast cancer patients. This finding could help predict the clinical outcome and inform decisions about treatment, mainly in hormone receptor-positive or HER2-negative breast cancer subgroups.

Here we propose that the communication through exosomes between cancer and surrounding cells stimulate tumor progression and metastasis, particularly when exosomes are released by breast cancer cells with stemness and metastatic properties. Our study reveals that CXCR4-exosomes promote breast cancer cells proliferation, motility and metastasis, generating an enhanced tumorigenesis phenotype. Furthermore, our findings contribute to the identification of a breast cancer prognostic signature, which could be easily translated into clinical practice since these markers are obtained by a non-invasive method. This signature could also be used during patients’ follow-up to identify patients with worse prognosis. This data exemplify the ongoing efforts to understand the involvement of stemness and metastatic-related nucleic acids contents in exosomes in cancer progression. Search for new specific therapies against these exosomes would offer a synergistic effect with current therapies in those patients usually with worse outcome. In this way, CXCR4-related stemness properties displayed by tumor cells with metastatic capacity could be potentially exploited for therapeutic targeting of CSC using treatment anti-CXCR4 (e.g. TN14003 or AMD3100), also avoiding the effects of their exosomes.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Cell lines were obtained from American Type Culture Collection. For culture conditions details, see Supplementary Material.

T47D and MDA-MB-231 cells were stably transfected with Precision LentiORF expression vectors encoding CXCR4 or RFP control particles (Thermo Scientific), using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). One week post-transfection, CXCR4 and RFP-mock expressing cells were selected by sorter and expanded in RPMI supplemented with 20% FBS. MDA-MB-231^{FLuc} cells [24] were kindly provided by Dr. L. Vallina (University Hospital Puerta de Hierro Research Institute, Madrid, Spain).

Exosome isolation, identification and quantification

Cell lines were cultured in media supplemented with exosome-depleted FBS. FBS was depleted of bovine exosomes by passage through a 0.22- μ m PVDF filter (Millipore) and ultracentrifugation at 120,000 *g* for 90 minutes. Exosomes were isolated from cell supernatants by a series of centrifugation and filtration steps (see Supplementary Material). The exosome pellet was resuspended in 200 μ L of phosphate-buffered saline (PBS) or medium with 1% exosome-depleted FBS. Circulating exosomes were isolated from human plasma with ExoQuickTM plus Thromboplastin D Kit (System Bioscience), in line with the manufacturer’s instructions.

For identification by transmission electron microscopy (model JEOL Jem1010, 100 kV) exosomes were fixed in 2% PFA (w/v) in 200 mM phosphate buffer (pH 7.4). Fixed exosomes were dropped onto a formvar-carbon-coated grid and left to dry at room temperature for 20 minutes. After washing in PBS, the exosomes were fixed in 1% glutaraldehyde for 5 minutes, washed in water and stained with saturated aqueous uranyl oxalate for 5 minutes. Samples were then embedded in 0.4% (w/v) uranyl acetate and 1.8% (w/v) methylcellulose and incubated on ice for 10 minutes. The excess liquid was then removed. The grid was dried at room temperature for 10 minutes and viewed at 80,000 and 120,000 magnification.

LM10 nanoparticle characterization system (NanoSight) was used for real-time characterization and quantification of the vesicles in supernatant fractions and in samples from patients.

Exosome labeling

For the exosome-tracking experiments, purified exosomes from cell lines were fluorescently labeled using PKH67 membrane dye (Sigma-Aldrich) following the manufacturer’s instructions. Images were collected with a TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems). For details, see Supplementary Information.

Protein extraction and western blot analysis

Exosomes were lysed with T-PER Tissue Protein Extraction buffer (Thermo Scientific) containing a protease

and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific). Western Blots for CD63 (ab59479, Abcam), CD81 (349502, BioLegend Inc.) and Calnexin (endoplasmic reticulum protein) as loading control (sc-11397, Santa Cruz Biotechnology) were performed. For details, see Supplementary Information.

RNA extraction, retrotranscription and mRNA quantitative analysis

Total RNA was extracted from cells and exosomes by the *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (Ambion Inc.). Retrotranscription and amplification were performed using Transcription first-strand cDNA Synthesis Kit and LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit in a Light-Cycler apparatus (Roche Diagnostics). For PCR Arrays analysis we used RT² PreAMP CDNA Synthesis Kit and RT² PreAMP Pathway Primer Mix for Stem Cell Transcription Factors and for Human Tumor Metastasis, in the appropriate PCR Arrays following the manufacturer's instructions (Qiagen). In the validation set, retrotranscription was achieved as described above. Next, we performed a specific pre-amplification using Real-Time Ready cDNA PreAMP Master using PreAMP Primer Pools, followed by Real-Time Ready Custom Panels in a Light-Cycler apparatus (Roche Diagnostics) in line with the manufacturer's instructions.

cDNAs were quantified by NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific); and concentrations were equalized to 100 µg/µL to standardize per cDNA amount.

The sequences of the primer sets and the reaction conditions are shown in Supplementary Table S5.

Proliferation assay

Proliferation assay was performed by seeding cell lines (20,000 cells/well) in 96-well E-plates in RPMI containing 1% exosome-depleted FBS for 24 and 48 hours. Similarly, T47D mock cells were incubated for 24 and 48 hours with CXCR4 or mock breast tumor-derived exosomes, and viable cells were detected using the MTT Cell Proliferation Assay Kit (Cayman Chemical Company). Absorbance was measured on a microplate reader at 570 nm (Multiskan Ex; Thermo Scientific).

Migration and invasion assays

Tumor cells (100,000 cells/well) were cultured using a 24-well E-plates Transwell with 8.0-µm pore polycarbonate membrane inserts (Costar, Corning Inc.) in RPMI containing 1% exosome-depleted FBS. For invasion assays, Matrigel was applied to the upper surface of the membranes of Transwells (BD Biosciences). Similarly, T47D mock cells were incubated with CXCR4 or mock breast tumor-derived exosomes. Migration and invasion rates were analyzed by CellTiter-Glo[®] Luminiscent Cell

Viability Assay (Promega Corp.) and fluorescence reader (Tecan Infinite 200 Pro).

Flow cytometry

Activity of ALDH was analyzed in cell lines using ALDEFLUOR assay (Stemcell Technologies) following the manufacturer's instructions. FACS analysis of surface antigens CD44 and CD49f was performed to identified subpopulation of breast cancer stem cells [25] (details in Supplementary Material). Data were acquired in a MACSQuant Analyzer using the MACSQuantifyTM Software version 2.5 (Miltenyi Biotec S.L.). Results reported as percentage of positive cells for ALDH and as mean fluorescence intensity (MFI) for CD44 and CD49f.

Animals and tumor xenografts

All experimental procedures were performed in accordance with the Spanish Government guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the Hospital Universitario Puerta de Hierro Animal Care and Use Committee (CEBA).

Five-week-old female athymic nude mice (Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu mice, Harlan Laboratories, Barcelona, Spain) were used for xenograft experiments. For the analysis of tumorigenesis, we injected 1×10^6 T47D-CXCR4 or T47D mock cells and 1×10^6 MDA-MB-231-CXCR4 or MDA-MB-231 mock cells suspended in a 20% Matrigel matrix (MatrigelTM Basement Membrane Matrix, BD Biosciences) into the second left mammary fat pad of each mouse. Tumors were measured three times per week using precision calipers. Tumor volume was calculated as $\text{width}^2 \times \text{length} \times 0.52$. To analyze the role of exosomes in tumor growth and metastasis, 1×10^6 MDA-MB-231^{FLuc} cells were injected into the mammary fat pad. For exosome treatment, 20 µg of CXCR4 or mock exosome (in a total volume of 200 µL of PBS) was injected into the tail vein three times a week for 5 weeks. Tumors were also measured three times per week. As mice injected with T47D mock cells did not develop tumors, mice were pre-treated with T47D-CXCR4-derived exosomes for three weeks before inoculation with T47D cells. After exosome pre-treatment, mice received the orthotopic inoculation of 1×10^6 T47D mock cells. From this point, T47D-CXCR4-derived exosomes and T47D-mock-derived exosomes were injected for three weeks.

At the end of experiments, mice were euthanized and their tumors and organs were excised for subsequent examination. The presence of metastatic cells in lymph nodes was assessed by fluorescence detection using a TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems) and analyzed by Leica Application Suite 2.02. Moreover, analysis of tumor growth and metastasis in mice with tumor generated by MDA-MB-231^{FLuc} was performed by *in vivo* and *ex vivo* BLI. For details, see Supplementary Material.

Immunohistochemistry analysis

Immunohistochemistry and mitotic rate analysis of mice tissue sections were performed as described elsewhere [26].

Patient samples, clinico-pathological parameters and follow-up

A series of 201 plasma samples from patients with breast cancer were provided by Biobank HUPH-M. The study was approved by the Research Ethics Board of the Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda. The parameters obtained from the medical records of all the patients, prospective follow-up and therapies are mentioned in Supplementary Material. OS and DFS, defined as the period from time of diagnosis until death and the interval between diagnosis and first recurrence, respectively, were the study end-points. Exosome mRNA was detected in the plasma of 173 patients. The remaining cases were eliminated from the study.

Statistical analysis

Comparisons between gene expression levels *in vitro* and functional effects on cancer cells were contrasted using the Student's *t*-test after evaluation of equality of variance with Levene's test. Results obtained from experiments requiring cultured cell lines and mice were expressed as mean \pm standard deviation of at least three separate experiments. For survival study patients, we used optimal criterion value corresponding with the Youden's index to divide mRNA data of evaluated genes in high or low levels to discriminate between two populations (presence or absence of first relapse and death for SLE and OS, respectively). The relationship between the cumulative probability of OS and PFS, as well as analyzed predictors, was calculated by the Kaplan-Meier method, while significant differences between curves were evaluated with Mantel's log-rank test. To identify factors that might be of independent significance in influencing OS and DFS, the Cox proportional risk regression model was used. The clinical-pathological parameters were contrasted with the presence of evaluated mRNA by the χ^2 test. In Box Plot representations, data were standardized by \log_{10} .

Two-tailed *p* values ≤ 0.05 were considered significant. *P*-values showed in figures are represented as: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; and ***, $p \leq 0.005$. The mean and standard deviation (SD) were calculated by using Prism V (Graphpad Software), and error bars represent the SD. Statistical analysis used the SPSS, version 14.0.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

Special thanks to Dr. Aránzazu García Grande for technical assistance in the Cell Sorting and Flow

Cytometry Department, to Dr. Elvira Ramil Tojeiro in the Sequencing Department at the University Hospital Puerta de Hierro Research Institute. The authors wish to thank the donors, and the Biobank HUPH-M for the human specimens used in this study. We thank to Dr. Francisco Sánchez-Madrid, Dr. María Mittelbrunn and Francesc Baixauli for assistance with the LM10 nanoparticle characterization system (NanoSight) and Dr. Francisco R. Urbano for technical assistance in Transmission Electron Microscopy at the Autónoma University of Madrid. We are grateful to Robin Rycroft for correcting the English.

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-AES2012: RTICC-RD12/0036/0041, RTICC-RD12/0036/0021 and FIS: PI12/02037) from the National I+D+I 2013-2016 Plan and co-financed by FEDER funds, SAF2010-20750, Fundación Banco Santander, Fundación Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) and CM: S2010/BMD-2344. During this study, Vanesa García-Barberán was supported by the Fundación AECC and ISCIII-RTICC-RD2012/0036/0006 (National I+D+I 2013-2016 Plan, FEDER funds co-financed).

CONFLICTS OF INTEREST

We state no conflicts of interest. The funding bodies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. The contents have not been published by or submitted to any other journal. No part of this manuscript has been included in any other manuscript.

REFERENCES

1. Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Research*. 2011; 71:3792–3801.
2. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Review*. 2013; 32:623–642.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2013; 63:11–30.
4. Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008; 12:374–390.
5. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414:105–111.
6. Shekhani MT, Jayanthi A-S, Maddodi N, Setaluri V. Cancer stem cells and tumor transdifferentiation: implications for novel therapeutic strategies. *American Journal of Stem Cells*. 2013; 2:52–61.
7. Clarke MF. Oncogenes, self-renewal and cancer. *Pathologie Biologie (Paris)*. 2006; 54:109–111.
8. Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *The New England Journal of Medicine*. 2008; 359:2814–2823.

9. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research Off Journal American Association for Cancer Research*. 2010; 16:2927–2931.
10. Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EGE, Walenkamp AM. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *European Journal of Cancer Oxf Engl 1990*. 2013; 49:219–230.
11. Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. *Leukemia*. 2009; 23:43–52.
12. Ablett MP, O'Brien CS, Sims AH, Farnie G, Clarke RB. A differential role for CXCR4 in the regulation of normal versus malignant breast stem cell activity. *Oncotarget*. 2014; 5:599–612.
13. Liao W-T, Ye Y-P, Deng Y-J, Bian X-W, Ding Y-Q. Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics. *American Journal of Stem Cells*. 2014; 3:46–62.
14. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur MH, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Research*. 2009; 69:1302–1313.
15. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research BCR*. 2011; 13:215.
16. Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008; 133:704–715.
17. EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Review Drug Discovery*. 2013; 12:347–357.
18. Floor S, van Staveren WCG, Larsimont D, Dumont JE, Maenhaut C. Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene*. 2011; 30:4609–4621.
19. Wu K-J, Yang M-H. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness: the Twist1-Bmi1 connection. *Biosciences Reports*. 2011; 31:449–455.
20. Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD, Dubrovskaya A. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *OncoTargets and Therapy*. 2013; 6:1347–1361.
21. Rhodes LV, Short SP, Neel NF, Salvo VA, Zhu Y, Elliott S, Wei Y, Yu D, Sun M, Muir SE, Fonseca JP, Bratton MR, Segar C, et al. Cytokine receptor CXCR4 mediates estrogen-independent tumorigenesis, metastasis, and resistance to endocrine therapy in human breast cancer. *Cancer Research*. 2011; 71:603–613.
22. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research BCR*. 2009; 11:R46.
23. Xu T-P, Shen H, Liu L-X, Shu Y-Q. The impact of chemokine receptor CXCR4 on breast cancer prognosis: a meta-analysis. *Cancer Epidemiology*. 2013; 37:725–731.
24. Fernández-Periáñez R, Molina-Privado I, Rojo F, Guijarro-Muñoz I, Alonso-Camino V, Zazo S, Compte M, Alvarez-Cienfuegos A, Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Alvarez-Méndez AM, Sanz L, Alvarez-Vallina L. Basement membrane-rich organoids with functional human blood vessels are permissive niches for human breast cancer metastasis. *PloS One*. 2013; 8:e72957.
25. Mannello F. Understanding breast cancer stem cell heterogeneity: time to move on to a new research paradigm. *BMC Medicine*. 2013; 11:169.
26. Soldevilla B, Rodríguez M, San Millán C, García V, Fernández-Periáñez R, Gil-Calderón B, García-Grande A, Silva J, Bonilla F, Domínguez G. Tumor-derived exosomes are enriched in β Np73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Human Molecular Genetics*. 2014; 23:467–478.